

Genetische und biochemische
Charakterisierung
Cytochrom c₁ defekter pet⁻ Mutanten
der Hefe
Saccharomyces cerevisiae

DISSERTATION
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Marietheres Schwieters
aus Marl

July 1981

Genetische und biochemische
Charakterisierung
Cytochrom c₁ defekter pet⁻ Mutanten
der Hefe
Saccharomyces cerevisiae

DISSERTATION
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Marietheres Schwieters
aus Marl

July 1981

1. Berichterstatter : Prof. Dr. F. Kaudewitz
2. Berichterstatter : Prof. Dr. W. Bandlow

Tag der mündlichen Prüfung : 30.7.1981



INHALTSVERZEICHNIS

A.	EINLEITUNG	1 - 6
B.	MATERIAL	7 - 10
C.	METHODEN	11 - 27
	<u>Teil I</u>	
1.	Stämme	11
2.	Mutationsinduktion	12
3.	Isolierung von pet^- Mutanten	13
4.	TTC - Overlay - Agar - Methode	13 - 14
5.	Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs	14
6.	Tieftemperatur - Spektroskopie an ganzen Zellen	14 - 15
	<u>Teil II</u>	
1.	Tetradenanalyse	15
2.	Komplementationsanalysen	16
3.	Sphaeroplastierung von Hefezellen	16
4.	Isolierung von Mitochondrien	16 - 17
5.	Markierungsbedingungen zur Identifizierung mitochondrialer und cytoplasmatischer Translationsprodukte	
5.1.	Homogene Markierung mit ^{35}S - Methionin an ganzen Zellen	17
5.2.	Markierung mit ^{35}S - Methionin in Gegenwart von Lävulinsäure	18
5.3.	Markierung von Sphaeroplasten mit ^{35}S -Methionin in Gegenwart von CCCP	18

6.	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamid - Gelen	19
7.	Immunologische Techniken	
7.1.	Elektrophoretischer Transfer von Proteinen von Polyacrylamid - Gelen auf Nitrozellulosepapier	19 - 20
7.2.	Immunpräzipitation	21 - 22
8.	Ein - dimensionale proteolytische Peptidkartierung	22
9.	Zwei - dimensionale proteolytische Peptidkartierung	23 - 24
10.	Nachweis von Hämproteinen in SDS-Gelen durch Tetramethylbenzidin	24 - 25
11.	Isolierung von cytoplasmatischer Hefe RNS	25
12.	<u>In vitro</u> Proteinsynthese im Retikulytenlysat	26 - 27
13.	Sonstige Methoden	27
14.	Abkürzungsverzeichnis	28 - 29
D.	ERGEBNISSE	30 - 77
	<u>Teil I</u>	
1.	Prinzip der pet^- Selektion	30
2.	Ausbeute an pet^- Mutanten nach Induktion mit verschiedenen Mutagenen	30 - 32
3.	Versuche zur Selektion von pet^- Mutanten mit TTC	32 - 34
4.	Weitere Charakterisierung der isolierten pet^- Mutanten	34 - 37
	<u>Teil II</u>	
	Genetische und biochemische Charakterisierung von Cytochrom c_1 defekten pet^- Mutanten	38

1.	Genetische Charakterisierung der c_1^- Mutanten	38 - 41
2.	Biochemische Vorcharakterisierung der c_1^- Mutanten	
2.1.	Enzymatische Tests	41 - 42
3.	Wirkung der Mutationen auf die Bildung von Apocytochrom c_1	
3.1.	Immunologische Untersuchungen aller c_1^- Mutanten unter "steady state" Bedingungen	43 - 46
3.2.	Immunologischer Nachweis des Apocytochroms c_1 nach Pulsmarkierung an ganzen Zellen	46 - 51
4.	Nachweis der Strukturverwandtschaft der identifizierten Cytochrom c_1 - Produkte	51 - 54
5.	Identifizierung des Cytochrom c_1 - Precursorpolypeptids in Gegenwart des Entkopplers CCCP	54 - 56
6.	Ein Modell für das Processing des Cytochroms c_1	56 - 59
7.	Nachweis der kovalent gebundenen Hämgruppe an Cytochrom c_1 Polypeptiden in c_1^- Mutanten	59 - 62
8.	Genetische Fragestellungen zur Reifung von Cytochrom c_1	62 - 66
9.	Zwei - dimensionale proteolytische "Fingerprints" zum Nachweis struktureller Veränderungen von Cytochrom c_1 Polypeptiden	66 - 70
10.	<u>In vitro</u> Proteinsynthese	71 - 76
11.	Korrelation der biochemischen und genetischen Daten	76 - 77

E.	DISKUSSION	78 - 86
F.	ZUSAMMENFASSUNG	87 - 89
G.	LITERATURVERZEICHNIS	90 - 94

A. E I N L E I T U N G

Mitochondrien sind die Organellen der oxydativen Phosphorylierung in allen eukaryotischen Zellen, die eine bedeutende Rolle für den Energiestoffwechsel der Zelle spielen. Sie werden von zwei Membranen umschlossen: einer äußeren Membran, mit einer derzeit noch weitgehend unbekannten Funktion, und einer Innenmembran, die Komponenten des Elektronentransports (Atmungskette) sowie die Maschinerie der Energiekonservierung (oxydative Phosphorylierung) trägt. Mitochondrien besitzen ein eigenes Genom und einen Transkriptions-Translationsapparat, der alle mitochondrialen RNS Komponenten sowie einige wenige, meist hydrophobe Polypeptide der Innenmembran synthetisiert. Die meisten mitochondrialen Polypeptide werden von nukleären Genen codiert, an cytoplasmatischen Ribosomen translatiert und in die Mitochondrien importiert.

Die Biogenese eines funktionsfähigen Mitochondriums fordert somit das Zusammenspiel zweier genetischer Systeme. Die enge Kopplung dieser Systeme zeigt sich besonders beim Zusammenbau einiger wichtiger Enzymkomplexe der Atmungskette bzw. der oxydativen Phosphorylierung (Schatz & Mason, 1973; Tzagoloff, 1971). So entstehen 3 von 7 Untereinheiten der Cytochrom-c-Oxidase, 2 von etwa 10 Untereinheiten der ATPase und das Apocytochrom b des bc_1 -Komplexes (etwa 7 Untereinheiten) in den Mitochondrien (Reviews: Schatz & Mason, 1974; Borst & Grivell, 1978). Die übrigen Polypeptide dieser Enzymkomplexe sind Syntheseprodukte des cytoplasmatischen Systems. Dieses Kenntnis über die Dualität der Herkunft mitochondrialer Proteine wurde vorwiegend durch Untersuchungen an

der Bäckerhefe Saccharomyces cerevisiae sowie am Pilz Neurospora crassa gewonnen.

Folgende Eigenschaften haben Saccharomyces cerevisiae in den letzten Jahren zum wichtigsten Experimentiersystem der mitochondrialen Biogenese-Forschung werden lassen:

Saccharomyces cerevisiae ist ein einzelliger Organismus, der unter verschiedenen kontrollierbaren Bedingungen einfach zu züchten ist. Seine zellulären Komponenten sind relativ leicht zu isolieren. Die Translationsprodukte des mitochondrialen oder cytoplasmatischen Systems lassen sich durch Zugabe radioaktiver Precursoren zum Wachstumsmedium markieren. In Gegenwart spezifischer Inhibitoren kann gezielt eines der beiden genetischen Systeme blockiert werden. Dies ermöglicht die Diskriminierung zwischen cytoplasmatischen und mitochondrialen Translationsprodukten. Der Hefeorganismus ist genetisch leicht zu manipulieren und zudem fähig, ohne oxydative Phosphorylierung zu überleben.

Als fakultativer Aerobier kann die Hefe die zum Wachstum notwendige Energie durch Fermentation gewinnen. Dadurch ist es möglich, Defekte zu analysieren, die sowohl im mitochondrialen als auch im karyotischen genetischen System mitochondriale Funktionen beeinflussen. Ausfälle mitochondrialer Produkte wären in anderen Organismen letal.

Die bisher beschriebenen Mutanten der Hefe Saccharomyces cerevisiae mit funktionellen Defekten der Atmung und der oxydativen Phosphorylierung können drei Gruppen zugeordnet werden:

1. cytoplasmatische "petites"

ρ^- Mutanten, deren mitochondriale Proteinsynthese als Ergebnis einer Makrodeletion der mitDNS ausgefallen ist und ρ^0 Mutanten, die einen vollständigen Verlust der mitDNS aufweisen;

2. mit^- Mutanten, die trotz eines spezifischen Ausfalls eines mitochondrialen Proteins zur Proteinsynthese fähig sind;

3. pet^- Mutanten, rezessive karyotische Mutanten, die im Gegensatz zu den oben genannten extrakaryotischen Mutanten einen mendelnden Erbgang aufweisen.

Das bevorzugte Interesse der letzten Jahre galt der genetischen Charakterisierung des mitochondrialen Genoms. So konnte mit Hilfe zahlreicher cytoplasmatischer Mutanten von Saccharomyces cerevisiae der Codierungsgehalt der mitDNS entschlüsselt werden. Die Gen-Genproduktbeziehung nahezu aller mitochondrial synthetisierten Proteine konnten aufgedeckt und in jüngster Vergangenheit die DNS-Sequenzen fast aller mitochondrialen Gene ermittelt werden (Review: Borst & Grivell, 1978; Kroon & Saccone, 1980).

Ein bedeutender Markstein wurde kürzlich erreicht durch die Totalsequenzierung des menschlichen, mitochondrialen Genoms (Anderson et al., 1981).

Im Gegensatz zu der Fülle von Ergebnissen, welche die intensiven Studien am mitochondrialen genetischen System erbrachten, ist unsere Kenntnis über die karyotischen Gene mitochondrialer Proteine äußerst limitiert. Obwohl bereits 1953 von Ephrussi die ersten pet^- Mutanten isoliert

wurden und chromosomale Mutanten in mehr als 100 Loci des Kerngenoms bekannt sind (Lloyd, 1974; Gillham, 1978), gelang es bisher nur in einem Fall einen Kernlocus mit einem spezifischen mitochondrialen Protein zu korrelieren. Die bisher ausführlichsten genetischen und biochemischen Analysen zur Gen-Genproduktbeziehung - am CYC 1 Locus und dem Apoprotein c - erfolgten durch Sherman und Stewart (1978). Die Isolierung einer Vielzahl von Mutanten mit Ausfällen im Cytochrom c Spektrum erlaubten die Identifizierung und Charakterisierung des Strukturgens dieses löslichen Proteins der Atmungskette. Es ist derzeit das einzige mitochondriale Protein, von dem die Gesamtnucleotidsequenz des Strukturgens bekannt ist.

Alle übrigen Proteine der Atmungskette und der oxydativen Phosphorylierung sind mit ihren Polypeptidkomponenten in funktionale, membrangebundene Enzymkomplexe (-ATP-ase-bc₁-Cytochromoxidase-Komplex) integriert. Ebner & Schatz (1973) und Tzagoloff et al. (1975) suchten gezielt Kernmutanten, die funktionelle Defekte in der Atmung und in der oxydativen Phosphorylierung verursachen. Es gelang den Autoren eine geringe Anzahl von Mutanten zu isolieren, die durch den Ausfall der enzymatischen Aktivität des Gesamtkomplexes definiert wurden. Eine weitere Eingrenzung auf eine der cytoplasmatisch synthetisierten Untereinheiten war, mangels geeigneter Nachweismethoden, nicht möglich. Die heute zur Verfügung stehenden monospezifischen Antisera und immunologischen "screening" Techniken für eine Vielzahl von Mutanten ermöglichen eine rasche Identifizierung cyto -

plasmatischer Proteine.

Dies gab den Anlaß, die Studien an Kernmutanten mit spezifischen Defekten in mitochondrialen Enzymkomplexen wieder aufzunehmen und weiterzuführen.

Zur Problemstellung der vorliegenden Arbeit sollten atmungsdefekte, karyotische Mutanten (pet^-) der Hefe Saccharomyces cerevisiae isoliert und charakterisiert werden, die einen spezifischen Ausfall des Cytochroms c_1 des bc_1 -Komplexes der Atmungskette aufweisen.

Cytochrom c_1^- Mutanten zu isolieren lag im Interessenbereich der Arbeitsgruppe, die seit Jahren die Biogenese und Funktion des bc_1 -Komplexes studiert.

Die folgenden Kriterien führten zur Auswahl dieses Mutantentyps:

Ross & Schatz (1976) isolierten Cytochrom c_1 aus Mitochondrien von Saccharomyces cerevisiae und identifizierten es als ein Polypeptid mit einem MG von 31 Kd, das eine kovalent gebundene Hämgruppe trägt und an cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert wird. Cytochrom c_1 ist an der Außenseite der Innenmembran des Mitochondriums lokalisiert. Das hämtragende Cytochrom c_1 ist spektroskopisch leicht erfaßbar (Absorptionsmaximum 553 nm bei 77° Kelvin). Das alleinige Fehlen seines charakteristischen Spektrums in einer Mutante deutet auf einen Defekt in der Biogenese hin. Vorstellbar sind Defekte auf verschiedenen Stufen wie der Expression des Cytochrom c_1 codierenden Genes, der Biosynthese des Cytochrom c_1 -Polypeptids, des posttranslationalen "Processings", des Transports ins Mitochondrium und der Assemblierung in

den bc_1 -Komplex.

Ausgehend von diesen Überlegungen wurde für diese Arbeit folgender experimenteller Ansatz gewählt:

- a) Anwendung eines Selektionsverfahrens, das erlaubt, aus einer großen Anzahl von pet^- Mutanten rasch Cytochrom c_1 defekte Mutanten zu isolieren;
- b) Durchführung einer Komplementationsanalyse; dies sollte in erster Annäherung eine Gruppierung der Mutationen in dem Sinne zulassen, daß nicht komplementierende Mutanten einen Defekt im gleichen Biogeneseschritt aufweisen;
- c) Einsatz von gelelektrophoretischen Analysen in Verbindung mit immunologischen Verfahren, um mutationsbedingte Veränderungen oder den Verlust des Cytochrom c_1 -Polypeptids feststellen zu können.

Die Korrelation der genetischen und biochemischen Daten sollte erlauben, das chromosomale Strukturgen für Cytochrom c_1 zu identifizieren.

B. M A T E R I A L

1. Medien

- a) YPD :
- | | | |
|-----|---|--------------|
| 1 | % | Yeastextrakt |
| 3 | % | Glucose |
| 1,5 | % | Agar |
- b) YPGal:
- | | | |
|-----|---|--------------|
| 1 | % | Yeastextrakt |
| 3 | % | Galaktose |
| 1,5 | % | Agar |
- c) YPG :
- | | | |
|-----|---|--------------|
| 1 | % | Yeastextrakt |
| 3 | % | Glyzerin |
| 1,5 | % | Agar |
- d) YPÄG :
- wie YPG
- | | | |
|---|---|---------|
| 1 | % | Äthanol |
|---|---|---------|
- e) YNB :
- | | | |
|------|---|---------------------|
| 0,67 | % | Yeast Nitrogen Base |
| 2 | % | Glucose |

f) Presporulationsmedium :

- | | | |
|-----|---|--------------|
| 0,8 | % | Yeastextrakt |
| 0,3 | % | Pepton |
| 10 | % | Glucose |
| 2 | % | Agar |

g) Sporulationsmedium :

- | | | |
|------|---|--------------|
| 0,1 | % | Yeastextrakt |
| 0,05 | % | Glucose |
| 1 | % | Kaliumacetat |
| 2 | % | Agar |

h) TTC-Overlay-Agar :

- 1 % TTC (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid)
- 2 % Agar
- 70 mM Phosphatpuffer pH 7,0

i) Flüssigmedien :

Es werden die selben Medien wie beschrieben verwendet, nur ohne Zusatz von Agar.

2. Pufferlösungen

- a) Phosphatpuffer 1 M pH 7,0
nach Sørensen (KH_2PO_4 / Na_2HPO_4)
- b) "Low sulphate medium" (LSM)

Stammlösungen:

Salze	$(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$	60	g
	MgCl	1,9	g
	NH_4Cl	16,2	g
	KH_2PO_4	10	g
	NaCl	1	g
	CaCl	1	g
	H_2O dest.	ad 900	ml
Spurenelemente	Borsäure	500	mg
	CaSO_4	40	mg
	KJ	100	mg
	MnSO_4	400	mg
	Na_2MoO_4	200	mg
	ZnSO_4	400	mg
	H_2O dest.	ad 1	l

Vitamine	Ca-panthothenat	80	mg
	Thiamin-HCl	80	mg
	Pyridoxin	80	mg
	Nicotinsäure	20	mg
	Biotin	0,8	mg
	H ₂ O dest.	ad 200	ml
Inositol-Lösung	Meso-Inositol	200	g
	H ₂ O dest.	ad 1	l
FeCl ₃ -Lösung	FeCl ₃ · 6 H ₂ O	200	mg
	H ₂ O dest.	ad 1	l

Zur Herstellung von LSM werden die autoklavierten Stammlösungen wie folgt gemischt:

Salze	90	ml
Spurenelemente	1	ml
Vitamine	5	ml
Inositol	1	ml
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	1	ml
H ₂ O dest.	ad 1	l

c) "Sample buffer"

0,125	M	Tris-HCl	pH 6,8
6	%	SDS	
6	mM	EDTA	
30	%	Glycerol	
0,03	%	Bromphenol blau	

d) Scintillations-Mix

4	g	PPD
0,1	g	Dimethyl POPOP
ad	1 l	Toluol

3. Chemikalien

Alle Chemikalien waren vom höchsten verfügbaren Reinheitsgrad. Soweit nicht anders angegeben wurden sie von der Firma Merk, Darmstadt, bezogen.

BSA	Behring, Marburg
fötale Kälberserum	Gibco, Paisley
Naragase	Serva, Heidelberg
Polyacrylamid	BDH, Poole
Protein A	Deutsche Pharmacia, Freiburg
Staphylococcus aureus V8	Miles
Tris (Trizma Base)	Sigma, St. Louis
Triton x 100	Serva, Heidelberg
Trypsin (TPCK behandelt)	Worthington Biochemical Company
Medien	Difco, Detroit
Substanzen für Elektrophorese	Serva, Heidelberg
Radioaktive Substanzen	Amersham-Buchler, Braunschweig
Lösungsmittel und Scintillatoren	Packard, Frankfurt
Zymolase	Kirin Brewery Co., Ltd., Takasaki, Japan

C. M E T H O D E N

Teil I : Isolierung von karyotischen Mutanten mit spezifischen Defekten in der Atmungskette

1. Stämme

Die Stämme der Hefe Saccharomyces cerevisiae, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

<u>Stamm</u>		<u>Kerngenotyp</u>	<u>Herkunft</u>
SM 11-6C	<u>a</u>	ura ⁻	Schweyen et al., 1976
SM 11-6C	<u>a</u>	ura ⁻ cym ⁻	umgekreuzt, Lang, 1978
FM 6	<u>α</u>	ade ⁻ his ⁻	SM 11-6C umgekreuzt, Lang, 1979
BM 1421-3C (rho ⁰)	<u>a</u>	his ¹ trp ² tsp 25	aus der Kreuzung BM 25-1B x Kl 14-4A
Il 993-5C (rho ⁰)	<u>α</u>	ilv ⁻	Wolf et al., 1973

a) Nomenklatur

<u>a</u> und <u>α</u>	bezeichnen den Paarungstyp
pet ⁻	bezeichnet atmungsdefekte <u>karyotische</u> Mutanten, die nur noch auf vergärbaren Substraten wachsen können.
rho ⁻	sind atmungsdefekte Mutanten, deren mitochondriale Proteinsynthese als Folge einer Makrodeletion der <u>mit</u> DNS ausgefallen ist.
rho ⁺	bezeichnet Hefezellen mit intaktem mitochondrialen Genom und funktionsfähigem Proteinsynthesystem.

ρ^0 charakterisiert den vollständigen Verlust der mitDNS.
 mit^- sind mitochondriale Mutanten mit funktionsfähigem Proteinsyntheseapparat, die die Befähigung auf nicht vergärbaren Substraten zu wachsen, verloren haben.

2. Mutationsinduktion

Zellen der Hefe Saccharomyces cerevisiae wurden jeweils in 10 ml YPG-Medium über Nacht bei 30°C geschüttelt. Bei einem Titer von 1×10^8 Zellen/ml wurden die Zellsuspensionen abzentrifugiert und in YPD-Medium aufgenommen. Nach 2 Stunden Inkubation bei 30°C wurde das entsprechende Mutagen hinzugegeben. Die Zellkulturen wurden bis zu 60 Minuten bei 30°C inkubiert, anschließend 2x in Phosphatpuffer oder sterilem dest. Wasser gewaschen und in YPD-Medium zu einem Titer von 1×10^6 Zellen/ml aufgenommen.

Nach Zwischenbebrütung bei Raumtemperatur von 2-5 Zellgenerationen wurden jeweils ca 100 Zellen auf YPD-Agar ausplattiert und bei 30°C bebrütet.

Die gewachsenen Zellen wurden auf YPÄG-Platten gestempelt und bei 30°C bebrütet.

Folgende Mutagene wurden wie beschrieben eingesetzt:

Mutagen	Endkonzentration	Inkubationsdauer in Minuten
1. NG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin)	15 μ /ml	30' / 60'

Mutagen	Endkonzentration	Inkubationsdauer in Minuten
2. MMS (Methylmethansulfonat)	15 μ /ml	30'
3. Nitrit	130 mM	3'

Zur Mutagenese mit Nitrit wurden die in YPG-Medium gezüchteten Zellen abzentrifugiert und in 0,25 M Natrium-Acetat-Puffer, pH 4,3 aufgenommen. Die weitere Behandlung erfolgte wie vorhergehend beschrieben.

3. Isolierung von pet^- Mutanten

Nach Mutationsinduktion mit den angegebenen Mutagenen wurden alle Kolonien, die nur noch auf vergärbaren Substraten wachsen konnten, abisoliert.

Um rezessive karyotische pet^- Mutanten von mitochondrialen rho^- oder mit^- Mutanten zu unterscheiden, wurden alle abisolierten Kolonien mit einem rho^0 -Testerstamm gekreuzt. Alle atmungsdefekten Kolonien aus a Stämmen wurden mit dem rho^0 Stamm Il 993-5C ω und alle Kolonien aus den ω Stämmen mit dem rho^0 Stamm BM 1421-3C a gekreuzt.

Pet^- Mutanten können nach Diploidisierung wieder auf nicht vergärbaren Substraten wie Glyzerin oder Äthanol wachsen, während mit^- und rho^- Mutanten diese Fähigkeit nicht wiedererlangen.

4. TTC-Overlay-Agar-Methode

Die selektierten pet^- Mutanten wurden auf YPD-Platten ausgestrichen. Nach einem Tag Bebrütung bei 30°C wurden die

Kolonien mit 40°C heißem Agar überschichtet, dem TTC zugesetzt worden war (Ogur et al., 1957). Nach einer Stunde konnte die unterschiedliche Rotfärbung der Kolonien ausgewertet werden. Die weißen und rosa Kolonien wurden auf ihre Atmungsdefizienz getestet.

Pet⁻ Mutanten mit geringer Atmung (< 20%) wurden in Mikrotiterplatten aufgehoben und bei -20°C eingefroren.

5. Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs

Die Ermittlung des Sauerstoffverbrauchs erfolgte in einem geschlossenen Gefäß von 2 ml Testvolumen mit einer Sauerstoffelektrode (Eschweiler) bei 23°C.

Zur Berechnung der spezifischen Aktivität ($\mu\text{mol O}_2/\text{min} \times 10^7$ Zellen, Estabrook, 1967) der pet⁻ Mutanten wurde der O₂ Verbrauch des Wildtyps gleich 100% gesetzt. Alle Messungen wurden an ganzen Zellen durchgeführt bei gleichzeitiger Überprüfung der KCN-Hemmbarkeit.

6. Tiefemperatur-Spektroskopie an ganzen Zellen

Die zu testenden Mutantenzellen wurden auf Galaktoseplatten ausgestrichen und 3 Tage bei 30°C bebrütet. Die Zellen eines Quadrantenausstriches wurden in 0,6 ml 50% Glyzerin aufgenommen, mit Dithionit reduziert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Differenzspektren der Cytochrome wurden in einem Zweistrahl-spektralphotometer (Shimadzu-UV-210A) aufgezeichnet, das für die Tiefemperaturspektroskopie (Dr.B.Lang, unveröffentlicht) umgebaut wurde. Als Referenz

diente ein weißes Papier , welches die Trübung der Suspension kompensierte. Bei 77⁰ Kelvin wurden die Spektren im Wellenlängenbereich von 620-500 nm aufgezeichnet.

M E T H O D E N : Teil II

1. Tetradenanalyse

Zellen der c₁⁻ Mutanten und Wildtypen wurden in 3% Glucose-medium gezüchtet. Etwa 1 x 10⁷ Zellen/ml jedes Kreuzungspartners wurden gemischt und in 3 ml YPD-Medium aufgenommen. Nach Zentrifugation (3000 rpm, 5 Minuten) blieb das Kreuzungsgemisch 3-4 Stunden stehen. In dieser Zeit trat Zygotenbildung ein. Die Zellen wurden in Minimalmedium aufgenommen und 0,1 ml auf Minimalagar plattiert, auf dem nur Diploide oder prototrophe, haploide Kolonien wachsen können.

Zur Tetradenanalyse wurden diploide Kolonien, die auf Minimalagar gewachsen waren, abisoliert, in YPD-Medium bis zur stationären Phase gezüchtet, in H₂O dest. gewaschen und auf Kalium-Acetat-Agar ausgetropft. Innerhalb von 3-5 Tagen trat Sporulation der Diploiden ein. Zur Analyse der Tetraden wurden diese in 1 ml H₂O dest. suspendiert und 20 Minuten mit 50 µl Helicase (Boehringer, Mannheim) inkubiert, um die Ascuswände anzudauen. Von dieser Suspension wurde ein Tropfen auf YPD-Agar gegeben und ausgestrichen. Die 4 Sporen eines Ascus konnten mit Hilfe eines Mikromanipulators (Leitz) voneinander getrennt und auf der Agarplatte verteilt werden. Nach 3-5 Tagen wuchsen die Sporen zu Kolonien heran, die durch Stempeln auf Selektionsmedien auf ihren Paarungstyp und ihre Auxotrophien getestet wurden.

2. Komplementationsanalyse

Die durch Tetradenanalyse gewonnenen Segreganten wurden paarweise gekreuzt (vgl. Methoden Teil II 1.), anschließend wurden die daraus entstandenen diploiden Nachkommen auf Glycerinagar gestempelt, um ihre Atmungskompetenz zu untersuchen. Alle Kolonien, die die Atmungskompetenz nicht komplementieren konnten, d.h. die als Diploide nicht auf Glycerinagar gewachsen waren, wurden einer Komplementationsgruppe zugeordnet.

3. Sphaeroplastierung von Hefezellen

Hefezellen wurden in YPGal-Medium bis zur frühen stationären Wachstumsphase gezüchtet und 2x mit H₂O dest. gewaschen, anschließend zentrifugiert (5000 rpm, 3 Minuten), das Naßgewicht bestimmt und in Sorbitolpuffer aufgenommen (1.2 M Sorbitol, 20 mM KPi, pH 7,4). Die Konzentration war jeweils 100 mg Naßgewicht/ml Puffer. Zur Sphaeroplastierung der Zellen wurde Zymolase (Kirin Brewery, 0,5 mg/ml) hinzugefügt und bei 30°C 20-40 Minuten inkubiert. Die Sphaeroplastenbildung wurde unter dem Mikroskop verfolgt. Anschließend wurde das Zellhomogenat 2x mit Sorbitolpuffer gewaschen und nach Zentrifugation sofort in 20% SDS 5-10 Minuten gekocht, dadurch wurden Membranproteine gelöst und Proteolyse verhindert.

4. Isolierung von Mitochondrien

Zellkulturen wurden in YPD- oder YPGal-Medium über Nacht gezüchtet. Bei einem Zelltitert von $5-8 \times 10^7$ Zellen /ml wur-

den die Zellen abzentrifugiert (3000 rpm, 5 Minuten) und 2x in H_2O dest. gewaschen. Der Zellaufschluß erfolgte entweder durch osmotische Lyse von enzymatisch protoplastierten Zellen (Schatz & Kováč, 1974) oder mechanisch mit Glasperlen (Mattoon & Balcavage, 1968). Die so gewonnene Zellsuspension wurde durch Zentrifugation (3000 rpm, 10 Minuten) von Zelltrümmern, Membranrückständen und Zellkernen gereinigt. Der Überstand wurde 20 Minuten bei 10 000 rpm zentrifugiert, um Mitochondrien und -fragmente anzureichern. Durch eine Aufeinanderfolge niedertouriger (3000 rpm) und hochtouriger (20 000 rpm) Zentrifugationsschritte wurden die Mitochondrien gereinigt und in Sorbitolpuffer aufgenommen. Zur Verhinderung von Proteolyse durch freigesetzte Proteasen wurde dem Puffer jeweils 1 mM PMSF zugesetzt.

5. Markierungsbedingungen zur Identifizierung mitochondrialer und cytoplasmatischer Translationsprodukte

5.1. Homogene Markierung mit ^{35}S -Methionin an ganzen Zellen

Hefezellen wurden in 100 ml YPD-Medium bis zur frühen logarithmischen Wachstumsphase gezüchtet, 2x mit H_2O dest. gewaschen, in "Low Sulfate-Medium" (0,3% Glucose, 0,1% Yeast-extrakt), welches mit Aminosäuren supplementiert war, aufgenommen und 90 Minuten inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und entsprechend ihrem Naßgewicht in 0,1 g/ml Medium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen bei 29°C mit 1 mCi 1-3 Stunden markiert.

5.2. Markierung mit ^{35}S -Methionin in Gegenwart von Levulinsäure

Wildtypzellen wurden in 100 ml "Low Sulfate-Medium" (2% Galaktose, 0,2 % Yeastextrakt) bis zur frühen logarithmischen Phase gezüchtet. Nach Ermittlung des Naßgewichts wurden die Zellen im gleichen Medium (0,1 g/ml) aufgenommen und Levulinsäure in einer Konzentration von 75 mM hinzugefügt. Eine Stammlösung von 1M Levulinsäure wurde mit Medium angesetzt und der pH mit NaOH auf 4,5 eingestellt. Zur Akkumulation des intermediären c_1 -Produktes wurden die Zellen 5 Stunden bei 29°C geschüttelt und anschließend mit 2 mCi Methionin 1 Stunde markiert.

5.3. Markierung von Sphaeroplasten mit ^{35}S -Methionin in Gegenwart von CCCP

Die Sphaeroplastierung von Hefezellen erfolgte wie in Methoden II 3. beschrieben. Das Zellhomogenat wurde hier nicht sofort gekocht, sondern in 1.2 M Sorbitol, "Low Sulfate-Medium", 0,3% Glucose entsprechend seinem Naßgewicht (100 mg/ml) aufgenommen. Dieses Medium diente zur Regeneration der Sphaeroplasten, die 60 Minuten bei 29°C inkubiert wurden. Nach der Regenerationszeit wurde 1 mCi Methionin hinzugegeben und zum gleichen Zeitpunkt 20 μmol CCCP. Die Reaktion des Entkopplers CCCP ist stark pH abhängig. Die optimale Wirkungsweise des CCCP liegt bei einem pH-Wert 6,0 und wurde deswegen im benutzten Markierungsmedium mit 1 M Tris-Base eingestellt. Die Pulsmarkierung mit ^{35}S -Methionin wurde für 20 Minuten bei 29°C durchgeführt.

6. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen

Proteine wurden in SDS-Polyacrylamid-Gelen entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Als Trenngel fungierte entweder ein exponentieller Acrylamidgradient von 10-15% (Douglas & Butow, 1976), 12,5% oder 17,5% Acrylamid. Als Sammelgel diente 5% oder 6% Acrylamid. Dem von Laemli (1970) beschriebenen diskontinuierlichen Puffersystem wurde 0,02 M EDTA zugefügt. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA durchgeführt. Nach Beendigung des Laufs wurden die Gele 30 Minuten in 10% TCA, 20% Methanol fixiert; danach entweder mit 0,2% Coomassieblau angefärbt und mit 7,5% Essigsäure entfärbt bis die Proteinbanden klar zu erkennen waren oder mit 1 M Natriumsalicylate 20 Minuten behandelt. Diese Gele wurden getrocknet und fluographiert. Die Exposition des Films (Kodak-Royal X-Omat XR-5) erfolgte bei -80°C .

7. Immunologische Techniken

7.1. Elektrophoretischer Transfer von Proteinen von Polyacrylamid-Gelen auf Nitrozellulosepapier

Diese Methode von Towbin et al. (1979) ermöglichte ein rasches "Screenen" vieler Mutanten ohne die vorher aufwendige Markierung von Proteinen in vivo.

Fraktionierte Mutantensphaeroplasten (vgl. Methoden II 3.) wurden in 12,5% SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt. Nach dem Lauf wurden die Gele mit Nitrozellulosepapier (Poren-

größe 0,45 μm , Millipore) bedeckt und in einen Elektrophoretank transportiert. Der Tank war mit dem Puffer 20 mM Tris, 192 mM Glycine, 20% Methanol pH 8,3 gefüllt. Die Proteine wurden bei einer Stromstärke von 1 Ampere elektrophoretisch aus dem Gel auf Nitrozellulosepapier transferiert. Die Transferdauer lag zwischen 60 und 90 Minuten. Das Filterpapier- als Gelreplica- wurde 4 Stunden bei Raumtemperatur mit 5% fötalem Kälberserum und 3% BSA in PBS gewaschen (PBS: 1.4 M NaCl, 100 mM NaPO_4 , 0,1% Natriumazid pH 7,2), um zusätzliche Proteinbindungsstellen abzusättigen. 50-100 μl Antiserum wurden in 30 ml Kälberserum, 3% BSA in PBS aufgenommen und das Replica über Nacht bei $+4^\circ\text{C}$ inkubiert. Das ungebundene Antiserum wurde bei Raumtemperatur in 5 Waschschritten mit 5% Kälberserum/PBS herausgewaschen und das Replica mit einem zweiten Antikörper, der gegen die Immunglobuline des Antiserums gerichtet ist, inkubiert. Als zweiter Antikörper diente jodiertes Protein A. Es wurden auf 30 ml Kälberserum 3% BSA 1×10^8 cpm eingesetzt und 2 Stunden bei Raumtemperatur (oder über Nacht bei $+4^\circ\text{C}$) inkubiert. Das Replica wurde 5x bei Raumtemperatur in PBS gewaschen. Beim letzten Waschschriff wurde dem Puffer 1% Triton x 100 zugefügt und das Filterpapier getrocknet. Die zu identifizierenden Proteine sind durch die Bildung eines Immunkomplexes mit jodiertem Protein A nach Autoradiographie sichtbar und können analysiert werden. Diese Methode bietet den Vorteil auch geringe Mengen von Antigenen zu identifizieren.

7.2. Immunpräzipitation

Nach der homogenen Markierung mit ^{35}S -Methionin (vgl. Methoden II 5.1.) wurde der Zellsuspension sofort TCA in einer Endkonzentration von 20% zugefügt (Ohashi, unveröffentlicht). TCA tötet die Zellen, vermeidet Proteasewirkung und ermöglicht eine Konzentration der Proteinmenge auf ein kleines Volumen. Die TCA behandelten Zellen wurden mit Glasperlen (0,4 mm, 3-5 Minuten) mit Hilfe eines Vortex aufgeschlossen. Die TCA präzipitierte Zellsuspension wurde in Zentrifugentubes transferiert, die Glasperlen 2x mit 5% TCA gewaschen und anschließend verworfen. Das Zellhomogenat wurde 15 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert und das Pellet in "Sample-buffer" mit 5% β -Mercaptoäthanol aufgenommen, mit 1 M Tris-Base neutralisiert und 5 Minuten gekocht. Nach Abkühlung der Proben auf Raumtemperatur wurde das Homogenat in Zentrifugentubes transferiert und im Ti 40-Rotor in einer Spinco-Ultrazentrifuge (Beckman) zentrifugiert (35 000 rpm, 30 Minuten). Der Überstand wurde in 50 ml Falcontubes pipettiert und mit TNET (50 mM Tris-Cl pH 8,0, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton x 100) zu einer SDS-Konzentration von 0,4% aufgefüllt und über Nacht bei +4°C mit 50 - 100 μl Antiserum inkubiert.

Die nachfolgende Immunpräzipitation wurde nach Kessler (1976) modifiziert.

Nach Inkubation wurden 0,1 - 0,3 ml einer 10% Suspension fixierter Staphylococcus aureus Zellen eingesetzt und für 3 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Diese Bakterienzellen tragen ein Membran-Protein A, das an Antigen-Anti-

Körperkomplexe bindet. Um nicht spezifisch gebundene radioaktive Proteine zu entfernen wurde 3x mit TNET gewaschen. Das Staphylococcus aureus Pellet wurde in 100-300 µl "Sample-buffer" aufgenommen und 3-5 Minuten gekocht. Hierdurch lösen sich die radioaktiven Immunkomplexe und werden durch Zentrifugation von den Staphylococcus aureus Zellen getrennt. Der Überstand wurde im SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Die am Filter gebundene Radioaktivitätsmenge wurde im Scintillationsmix im ISOCAP (Searl Nuclear Chicago) ermittelt.

8. Ein-dimensionale proteolytische Peptidkartierung

Ein-dimensionale proteolytische "fingerprints" dienen zum Nachweis von Strukturverwandtschaftsbeziehungen verschiedener Proteine nach begrenzter Proteolyse der Polypeptide mit spezifischen Proteasen.

Die zu vergleichende ³⁵S-Methionin-markierten Polypeptide wurden nach Immunpräzipitation und Auftrennung im SDS-Polyacrylamid-Gel (12,5%) als Proteinbanden aus dem getrockneten Gel herausgeschnitten. Die Gelstücke wurden mit 0.125 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 5 mM DTT äquilibriert und in Taschen eines zweiten Slabgels transferiert. Proteasen (Nagase, Staphylococcus aureus V 8) wurden in die Geltaschen hinzu pipettiert, und die nach partieller Proteolyse entstandenen Peptide nach der Methode von Cleveland et al. (1977) elektrophoretisch getrennt, anschließend fluographiert und das Verdauungsmuster analysiert.

9. Zwei-dimensionale proteolytische Peptidkartierung

Neben der Sequenzierung ist das zwei-dimensionale "peptide mapping" eine ausgezeichnete Methode strukturelle Veränderungen eines Polypeptids zu analysieren.

Die "fingerprints" entstehen durch Spaltung eines Proteins in Peptidfragmente mit einer geeigneten Protease, und anschließender elektrophoretischen Trennung der Peptide in der ersten Dimension und durch Dünnschichtchromatographie in der zweiten Dimension (Elder et al., 1977; Lewin et al., 1980). Durch diese zwei-dimensionale Trennung von Peptiden ist es möglich veränderte Aminosäuresequenzen nachzuweisen, die z.B. durch genetische Mutation entstanden sind.

Die zu identifizierenden ^{35}S -Methionin markierten Proteinbanden wurden aus dem getrockneten Gel herausgeschnitten und bei Raumtemperatur wie folgt gewaschen:

1 Tag in 25% Isopropanol, 10% Essigsäure; 3 Tage in 25% Isopropanol (mit einem Wechsel der Waschlösung nach einem Tag); 1 Tag in 10% Methanol.

Diese Waschprozedur ist notwendig, um das für die Chromatographie störende SDS aus den Gelstücken zu waschen. Die extrahierten Gelstücke wurden zerkleinert, unter Vakuum bei 50°C getrocknet, anschließend mit $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ Trypsin in 0,2% Amoniumbikarbonat pH 8,0 versetzt und 15 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Trypsinreaktion wurde mit einem Tropfen 70% Ameisensäure terminiert und der Überstand abpipettiert. Die verbleibenden Gelstücke wurden nochmals mit 50% HCOOH 12 Stunden bei 37°C extrahiert. Die dadurch erhaltenen Überstände wurden gereinigt, unter Vakuum getrocknet, in $200\text{ }\mu\text{l}$ 50% HCOOH aufgenommen und zur Entfernung von nicht löslichen

Anteilen 15 Minuten bei 6000 rpm zentrifugiert. Der klare Überstand wurde getrocknet (1 Stunde), in 5 μ l Elektrophoresepuffer (Essigsäure/Ameisensäure/ H_2O , 15:5:80 v/v) aufgenommen und auf eine Dünnschicht-Cellulose-Platte (Polygram Cel 300, 20 x 20) aufgetragen. Die Celluloseplatte wurde in zwei Dimensionen entwickelt. Die erste Dimension war die Flachbett-Elektrophorese in oben genanntem Puffer pH 1,7 bei 2°C und 1000 V ($\approx$ 30 mA). Die Laufzeit betrug 40 Minuten. Die zweite Dimension, nach Trocknen der Celluloseplatte, war die chromatographische Entwicklung in Pyridin/Butanol/Essigsäure/ H_2O : (12:15:3:12 v/v) und erfolgte für 5-6 Stunden. Das radioaktive Peptidmuster wurde durch Autoradiographie der getrockneten Celluloseplatte sichtbar gemacht und analysiert.

10. Nachweis von Hämproteinen in SDS-Gelen durch Tetramethylbenzidin

Thomas et al. (1976) beschreiben eine Methode, in der 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin als Reagenz benutzt wird, um hämtragende Proteine im SDS-Gel anzufärben und nachzuweisen. Jeweils 400 μ g Mitochondrienprotein wurde in 17,5% SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt. Nach dem Lauf wurden die Gele in 20% Methanol, 7,5% Essigsäure fixiert und anschließend 15 Minuten in 0.25 M Natriumacetatpuffer pH 5,0 gewaschen. 6.3 mM Tetramethylbenzidin wurde in Methanol gelöst und im Verhältnis 3:7 v/v mit Acetatpuffer pH 5,0 gemischt. Mit dieser Lösung wurden die Gele 20-40 Minuten behandelt und H_2O_2 (Endkonzentration 30 mM) hinzugefügt. Die Färbung trat nach 5-30 Minuten auf. Anschließend wurden die

Gele mit Isopropanol/0.25 M Natriumacetat pH 5,0 (3:7 v/v) behandelt, um die Farbintensität zu verstärken. Die angefärbten Gele wurden entweder photographiert oder "ge-scanned".

11. Isolierung von cytoplasmatischer Hefe RNS

Hefezellen wurden in YPD-Medium bis zur späten logarithmischen Phase gezüchtet, zentrifugiert und 1x mit H₂O dest. gewaschen. Das Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren, und die gefrorenen Zellen bei Raumtemperatur zu "Puder" zerkleinert. Dieser Extrakt wurde in 150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl pH 7,4, 4% SDS suspendiert und 3 Stunden mit Proteinase K (100 µg/ml) behandelt. Das Lysat wurde in Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (50:50:1 v/v) aufgenommen, bei Raumtemperatur 40 Minuten geschüttelt und dann 10 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Die organische Phase wurde mit 10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA pH 7,4 nochmals extrahiert, die wässrigen Phasen vereinigt und mit Chloroform-Phenol wiederholt extrahiert (Penman, 1966). Durch Zugabe von 2,5 Volumen kaltem Äthanol und NaCl (Endkonzentration 0,2 M) präzipitierten die Nukleinsäuren bei -20°C. Das getrocknete Präzipitat wurde in 10 mM Tris-Cl pH 7,4 aufgenommen, und mit LiCl (Endkonzentration 3 M) präzipitierten die RNS-Einzelstränge bei 0°C. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in 10 mM Tris-Cl pH 7,4 aufgenommen und die Reinheit der RNS durch Messung der optischen Dichte geprüft.

12. in vitro Proteinsynthese im Retikulozyten-Lysat

Das System der zellfreien Proteinsynthese im Retikulozytenlysate wurde benutzt, um Proteine zu identifizieren, die von einer spezifischen Hefe-m-RNS translatiert werden. Um den spezifischen Codierungsgehalt der Hefe-m-RNS zu bestimmen, muß die endogene RNS des Lysats zuerst unwirksam gemacht werden, bevor die Fremd-RNS (Hefe-RNS) hinzugefügt werden kann. Danach werden alle Proteine, die im Lysat synthetisiert werden, von der hinzugegebenen m-RNS programmiert. Es wurde wie folgt vorgegangen:

In Stickstoff eingefrorene Retikulozytenlysate (0,5 ml Volumen) wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und sofort 10 µl Hämin (1 mM) hinzugefügt. Hämin inaktiviert eine Proteinkinase, die die Proteinsynthese in Retikulozyten hemmt. Um die endogene RNS zu zerstören wurden 5 µl CaCl_2 (100 mM) und 1 µl Mikrococcus Nuklease (0,5 mg/ml) zugegeben. Nach 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit 10 µl EGTA (100 mM) gestoppt und in Eis gestellt.

Lösungen zur Proteinsynthese

<u>20_fach_konzentrierter_Puffer</u>				Endkonzentration	
200	mM	Tris HCl	pH 7,4	10	mM
2	M	KCl		100	mM
40	mM	MgCl_2		2	mM

10_fach_konzentrierter_"Energie-Mix"

10	mM	ATP		1	mM
2	mM	GTP		0.2	mM
0.3	mM	alle Aminosäuren ohne Methionin		0.03	mM
120	mM	Kreatin Phosphat		12	mM
1,6	mg/ml	Kreatin Kinase		0,16	mg/ml

Wenn die Nuklease inaktiviert ist, kann ohne Degradationsgefahr fremde m-RNS hinzugegeben werden. Das Lysat wurde mit 50 μ l des 20 fach konzentrierten Puffers, 100 μ l des "Energie-Mixes", 750 μ Ci 35 S-Methionin versetzt und die Hefe-RNS ca 500 μ g/ml ($\approx$ 10 OD) hinzugegeben. Die in vitro Translation verlief bei 28°C 60 Minuten. Die Reaktion wurde mit PMSF (1 mM) gestoppt. Anschließend wurde 200 μ l 20% SDS zupipettiert und die Proben sofort 3-5 Minuten gekocht. Um spezifische Proteine der neusynthetisierten, radioaktiven Proteine zur Identifizierung zu isolieren, wurden spezifische Antiseren eingesetzt. Nach Immunpräzipitation (vgl. Methoden II 7.2.) und Gelelektrophorese (vgl. Methoden II 6.) wurden die in vitro synthetisierten spezifischen Polypeptide durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

13. Sonstige Methoden

- a) Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Lowry et al.(1951) gemessen.
- b) Das Jodieren von Protein A erfolgte nach der Vorschrift von Thorell et al.(1971).
- c) Die Präparation von fixierten Staphylococcus aureus Zellen wurde nach der Methode von Maccechini et al.(1979) durchgeführt.
- d) Die Enzymteste an isolierten Mitochondrien erfolgten nach den Vorschriften von Schatz & Klima (1964) und Mason et al.(1973).

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
CCCP	Carbonylcyanid m-Chlorophenyl-hydrazon
CHX	Cycloheximid
cpm	counts (Zerfälle) pro Minute
DNS	Desoxyribonukleinsäure
<u>mit</u> DNS	mitochondriale DNS
EDTA	Äthylendiamintetraazetat
EGTA	Äthylenglykol-bis (β -amino-äthyläther) N,N'-tetraazetat
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
Kd	Kilodalton
KU	Klett-unit
M	molare Konzentration
MG	Molekulargewicht
min	Minute
mM	millimolare Konzentration
MMS	Methylmethansulfonat
NG	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
OD	optische Dichte
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POPOP	1,4-Di-2-(5-Phenyloxazol)-Benzol
PPD	2,5-Diphenyloxazol
RNS	Ribonukleinsäure
m-RNS	Messenger-RNS
rpm	Umdrehung pro Minute
SDS	Natriumlaurylsulfat

SU	Subunit (Untereinheit)
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton x 100	Cethylphenoxypolyethoxyäthanol
WT	Wildtyp

D. E R G E B N I S S E

Teil I : Isolierung von karyotischen Mutanten mit spezifischen Defekten in der Atmungskette

1. Prinzip der pet^- Mutanten Selektion

Zur Selektion von pet^- Mutanten wurden die unter Methoden I 1. aufgeführten Wildtypstämme von Saccharomyces cerevisiae ausgewählt. Diese Stämme zeichneten sich im Vergleich zu anderen durch eine geringe spontan Mutationsrate zum rho^- Zustand aus.

Das Prinzip der Selektion von pet^- Mutanten ist in Abb. 1 dargestellt. Nach Mutationsinduktion mit Mutagenen wie NG, MMS oder Nitrit wurden alle Kolonien, die nur noch auf vergärbaren Substraten wachsen konnten, abisoliert (vgl. Methoden I 2.). Um atmungsdefekte karyotische Mutanten (pet^-) von atmungsdefekten mitochondrialen Mutanten (rho^- und mit^-) unterscheiden zu können, erfolgte eine Diploidisierung mit einem rho^0 -Testerstamm (vgl. Methoden I 3.). Rezessive pet^- Mutanten sind dadurch erkennbar, daß sie nach Diploidisierung auf nicht vergärbaren Substraten wie Glycerin oder Äthanol wieder wachsen können, während dominante pet^- Mutanten, mit^- und rho^- Mutanten diese Fähigkeit nicht wiedererlangen.

2. Ausbeute an pet^- Mutanten nach Induktion mit verschiedenen Mutagenen

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der durchgeführten Mutationsinduktionen zusammengefaßt. Insgesamt konnte eine An-

Abb. 1 Selektion von pet^- Mutanten

Die mutagenisierten Zellen wurden auf Glucosemedium ausplattiert und auf Glycerin-Äthanol-Medium gestempelt. Alle Kolonien, die auf Glycerin-Äthanol nicht wuchsen, wurden auf Glucoseplatten transferiert (= RD-Mutanten).

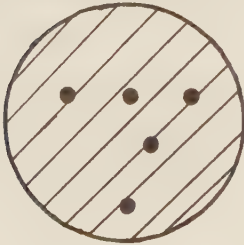
Glucosemedium



RD-Mutanten:

$\text{pet}^+ \text{rho}^- \text{mit}^+$
 $\text{pet}^+ \text{rho}^+ \text{mit}^-$
 $\text{pet}^- \text{rho}^-$
 $\text{pet}^- \text{rho}^+ \text{mit}^+$ = gesuchter Phänotyp

Minimalmedium mit rho^0 -Rasen



alle Kolonien wachsen nach
 Diploidisierung mit rho^- -
 Testerstamm

Glycerin-Äthanol-Medium



rezessive $\text{pet}^- \text{rho}^+ \text{mit}^+$

nicht wachsen können:
 $\text{pet}^+ \text{rho}^-$
 $\text{pet}^+ \text{rho}^+ \text{mit}^-$
 dominante $\text{pet}^- \text{rho}^+ \text{mit}^+$

● - Wachstum der Kolonien
 ○ - kein Wachstum der Kolonien

zahl von 3609 atmungsdefekten pet^- Mutanten isoliert werden. Davon erwiesen sich 84 als instabil. Sie mutierten bereits nach einigen Zellgenerationen zum Wildtypstamm zurück. Der prozentuale Anteil an pet^- Mutanten, bezogen auf die Anzahl aller getesteten Kolonien (45 545), war etwa 1,5%. Von allen atmungsdefekten Mutanten zeigten 19% den gesuchten pet^- Genotyp.

Stämme	eingesetzte Mutagene	Anzahl getesteter Kolonien	Anzahl RD	Anzahl pet^-	Revertanten Anzahl	%
SM11-6C	NG	9527	547	122	15	12,2
SM11-6C	NG	1432	259	60	5	8,3
SM11-6C	MMS	3413	388	52	7	13,4
SM11-6C	MMS	17869	560	100	23	23,0
FM 6	NG	1804	79	9	-	0
FM 6	Nitrit	11500	1776	347	34	9,7
Summe		45.545	3609	690	84	

Tabelle 1 : Ausbeute an pet^- Mutanten nach Induktionen mit verschiedenen Mutagenen.

3. Versuche zur Selektion von pet^- Mutanten mit TTC

Brock (1958) und Zsolt (1960) fanden, daß TTC, direkt in den Agar gegeben, das Wachstum atmender Hefezellen blockiert, während nicht atmende Zellen normal wachsen können. Bachhofen et al. (1979) sowie Wolf (Dissertation, 1973) konnten zeigen, daß atmungsdefekte Zellen mit TTC angereichert werden können. Es wurde deshalb versucht zur spezifischen An -

reicherung von pet^- Mutanten ebenfalls TTC einzusetzen.

Vorversuche zeigten allerdings, daß fast ausschließlich rho^- Mutanten angereichert wurden. Eine signifikante Anreicherung von pet^- Mutanten war bei Zugabe von TTC nicht zu beobachten.

Hilfreich hingegen war zur groben Klassifizierung der isolierten pet^- Mutanten die TTC-Overlay-Agar-Methode nach Ogur et al. (1957) (vgl. Methoden I 4.).

Theoretisch denkbar sind folgende Defekte:

1. Defekte in der Versorgung der Atmungskette mit reduzierenden Substraten wie NADH und/oder Succinat:
 - Mutanten mit Defekten im Glyzerinstoffwechsel oder im Krebszyklus;
2. Defekte in der Synthese funktionaler Atmungsenzymkomplexe:
 - in der Biosynthese einzelner Polypeptide der mitochondrialen Atmungskomplexe,
 - in der Biosynthese vom Coenzym Q,
 - in der Hämbiosynthese,
 - in der Riboflavinsynthese,
 - in der Lipidzusammensetzung der inneren Mitochondrienmembran;
3. Defekte in der Energiekonservierung (oxydative Phosphorylierung):
 - ATPase-Mutanten,
 - im Transport von ATP aus den Mitochondrien ins Cytoplasma.

Zellen mit intakter Atmungskette zeigen nach Überschichtung mit TTC-haltigem Weichagar eine Rotfärbung, während Mutanten mit defektem Elektronenfluß weiß bleiben. Die Färbung entsteht dadurch, daß atmende Zellen TTC zu 2,3,5-Triphenyl-Formazan reduzieren (Clark et al., 1965). Dieses lagert sich in den Zellen als unlöslicher Farbstoff ab.

Pet⁻ Mutanten, die nach TTC-overlay eine Rotfärbung aufzeigten, sollten demnach in der oxydativen Phosphorylierung (oder im Krebszyklus) defekt sein. Die rosa und weiß gefärbten Kolonien hingegen sollten hauptsächlich mutative Veränderungen in der Atmungskette tragen.

Da im Rahmen dieser Arbeit nur pet⁻ Mutanten mit spezifischen Defekten in der Atmungskette gesucht wurden, erfolgten weitere Charakterisierungen nur an pet⁻ Kolonien, die entweder weiß oder rosa gefärbt waren.

4. Weitere Charakterisierung der isolierten pet⁻ Mutanten

Um den Defekt in der Atmungskette weiter einzugrenzen, wurden Atmungsmessungen an ganzen Zellen durchgeführt (vgl. Methoden I 5.). Pet⁻ Mutanten mit sehr verminderter Zellatmung (<20%) wurden anschließend auf Galaktoseplatten gezüchtet und deren Cytochromausstattung durch Tieftemperspektroskopie an ganzen Zellen bestimmt (vgl. Methoden I 6.).

In der nachfolgenden Tabelle 2 ist die Anzahl jener pet⁻ Mutanten aufgeführt, die entweder einen spezifischen Ausfall eines der Cytochrome aufzeigten oder mit vollem Spektrum ausgestattet waren. Pet⁻ Mutanten mit verringertem

Cytochromgehalt sind hierbei nicht berücksichtigt. Ebenfalls nicht aufgeführt wurden pet^- Mutanten mit pleiotropem Ausfall mehrerer Cytochrome, da es sich bei diesen entweder um solche mit hoher Spontanmutationsrate zum rho^0 Zustand oder um Träger von Mutationen mit pleiotropen Nebenwirkungen handelt, die eine Zuordnung des Defektes stark erschweren.

Cytochromausstattung	Anzahl pet^- Mutanten
volles Spektrum (b^+ , c^+ , c_1^+ , aa_3^+)	88
Cytochrom aa_3^-	39
Cytochrom b^-	21
Cytochrom c^-	--
Cytochrom c_1^-	19

Tabelle 2: Anzahl der pet^- Mutanten, die entweder einen spezifischen Ausfall eines der Cytochrome aufzeigen oder mit vollem Spektrum ausgestattet sind.

Die Absorptionsspektren der in Tabelle 2 aufgeführten Mutantentypen sind in Abb. 2 dargestellt.

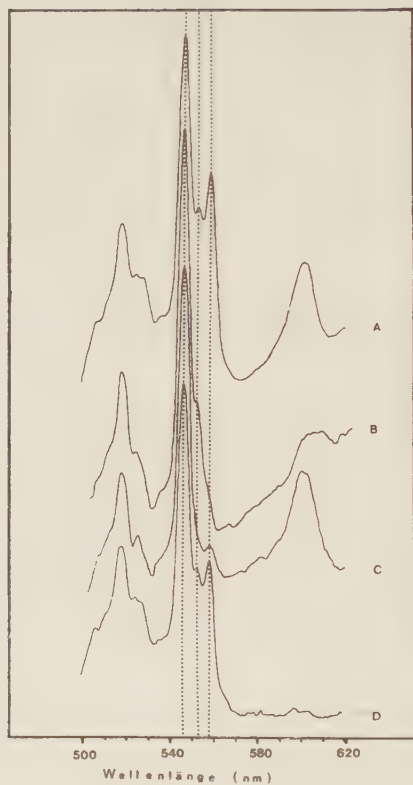


Abb. 2

Tieftemperaturspektren der pet^- Mutanten:

- A: Mutante 4405 (volles Spektrum)
- B: Mutante 1332 (Cytochrom b^-)
- C: Mutante 2408 (Cytochrom c_1^-)
- D: Mutante 1403 (Cytochrom aa_3^-)

Die gestrichelten Linien zeigen das Absorptionsmaximum der Cytochrome c (547 nm), c₁ (553 nm) und b (558).

Z U S A M M E N F A S S U N G : Teil I

Nach 6 Mutationsinduktionen konnten 690 rezessive karyotische pet^- Mutanten isoliert werden. Die geringste Reversionsrate zur Atmungskompetenz zeigte sich in den Wildtypstämmen nach Mutagenese mit NG und Nitrit. In 3 Induktionen wurde eine Inaktivierung von 10-18% gewählt, um die Ausbeute an pet^- Mutanten zu optimieren, obwohl die Wahrscheinlichkeit, hierdurch Doppelmutationen zu erzeugen, sehr groß ist.

Die Kombination von TTC-Overlay, Atmungsmessungen und Tief-temperaturspektren erlaubte eine rasche Bestimmung der Lokalisation von Ausfällen im bc_1 -Komplex der Atmungskette oder in der Cytochrom-c-Oxidase. Diese Merkmale zeigten 24,2% aller pet^- Mutanten.

Demnach kann der funktionale Defekt einem definierten Protein dieser Enzymkomplexe nicht eindeutig zugeordnet werden. Eine Ausnahme bilden pet^- Mutanten mit spektroskopisch nachweisbarem Ausfall des Cytochroms c_1 . Diese Klasse von Mutanten läßt auf einen spezifischen Defekt in der Biogenese dieses Proteins schließen.

Die weiterführenden genetischen und biochemischen Charakterisierungen der Cytochrom c_1^- Mutanten sind im nachfolgenden zweiten Teil der Dissertation beschrieben.

Teil II : Genetische und biochemische Charakterisierung von
Cytochrom c_1 defekten pet^- Mutanten

Bis auf eine Cytochrom c_1^- Mutante (2006) zeigten alle isolierten c_1^- Mutanten eine starke Tendenz zur Weitermutation zum $pet^- \rho^0$ oder $pet^- \rho^0$ Phänotyp oder revertierten zum Wildtypstamm zurück. Ständige Reinigungsschritte und Reisolierungsversuche erschwerten somit die Untersuchungen an diesen Cytochrom c_1^- Mutanten. Von Dr.Lang und anderen Mitarbeitern wurden weitere Mutanten isoliert. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe konnten nach Bestimmung der ρ^- Rate 8 relativ stabile Cytochrom c_1^- Mutanten für die weiteren Analysen zur Verfügung gestellt werden.

c_1^- Mutanten	Mutagene	Wildtypstämme
2006 <u>a</u> ura^-	NG	SM11-6C <u>a</u> ura^-
3101 <u>α</u> $ade^- his^-$	Nitrit	FM 5 <u>α</u> $ade^- his^-$
0802 <u>a</u> $ura^- cym^-$	Nitrit	SM11-6C <u>a</u> $ura^- cym^-$
1925 <u>α</u> $ade^- his^-$	NG	FM 5 <u>α</u> $ade^- his^-$
1304 <u>a</u> $ura^- cym^-$	Nitrit	SM11-6C <u>a</u> $ura^- cym^-$
005 <u>a</u> ura^-	Nitrit	SM11-6C <u>a</u> ura^-
2024 <u>α</u> $ade^- his^-$	NG	FM 5 <u>α</u> $ade^- his^-$
1165 <u>α</u> $ura^- ilv^-$	NG	ccr 91 <u>α</u> $ura^- ilv^-$

1. Genetische Charakterisierung der c_1^- Mutanten

Um den nukleären, monogenetischen und rezessiven Charakter der c_1^- Mutanten zu prüfen, wurden diese mit entsprechenden Wildtypstämmen gekreuzt: DA 2 ade^1 α und TF 2: his^4 a (abgeleitet vom Stamm D 273, F.Sherman). Diese Wildtypstämme,

die nahezu isogenisch sind, mußten gewählt werden, da die Mutanten einen Sporulationsdefekt tragen und nach Kreuzungen mit den Wildtypstämmen SM 11-6C und FM 5 nicht mehr sporulieren konnten.

Karyotische Mutationen zeigen das phänotypische Sporenverhältnis 2 : 2, cytoplasmatische 4 : 0 oder 0 : 4. Nach den Kreuzungen bestätigte die Tetradenanalyse, daß die untersuchten c_1^- Mutanten eindeutig karyotische-mendelnde Mutanten sind, deren Defekte wahrscheinlich auf die Mutation eines Kerngens zurückzuführen sind. Die Ergebnisse der Tetradenanalyse, in Tabelle 3 zusammengefaßt, zeigen eine 2 : 2 Aufspaltung des Cytochrom c_1 -defizienten Phänotyps in den meisten Asci.

c_1^- Mutanten gekreuzt mit WT	Anzahl getesteter Tetraden	Anzahl voll- ständiger Te- traden	Sporenver- hältnisse 2:2 3:1
3101	9	2	2
0802	9	3	3
1925	10	8	7 1
1304	15	5	5
0101	12	9	9
005	13	8	8
2006	14	12	11 1
2024	14	4	4
1165	14	4	4

Tabelle 3 : Tetradenanalyse aus Kreuzungen der c_1^- Mutanten mit den Wildtypstämmen DA 2 ade^1 a und TF 2 his^4 a.

Komplementen-Gruppe	$\frac{a}{\bar{a}}$	3101	0802	1304	1925	1165	2024	2006	0101	005
I	3101	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	0802	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	1304	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	1925	+	+	+	-	+	+	+	+	+
II	1165	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	2024	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	2006	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	0101	+	+	+	+	-	-	-	-	-
III	005	+	+	+	+	-	-	-	-	-

Tabelle 4: Komplementationsanalyse

Aus der Tabelle geht hervor, daß häufig nicht alle 4 Sporen einer Tetrade gewachsen sind. Die Ursache für den hohen Prozentsatz von nicht gewachsenen Sporen konnte nicht geklärt werden. Die Auxotrophien der isolierten Sporen wurden anschließend geprüft und ihr Paarungstyp festgestellt. Um eine Gruppierung der Mutationen zuzulassen, wurden die durch Tetradenanalyse erhaltenden Segreganten paarweise gekreuzt und die Atmungskompetenz der daraus resultierenden Diploiden getestet (vgl. Methoden II 2.). Alle nicht komplementierenden c_1^- Mutanten werden einer Gruppe zugeordnet. Nach diesen Analysen lassen sich die 9 c_1^- Mutanten in 3 Komplementationsgruppen einordnen, wobei eine Gruppe nur durch einen einzigen Stamm repräsentiert wird. Die Zuordnung der Mutanten zu den drei Komplementationsgruppen ist aus Tabelle 4 ersichtlich.

2. Biochemische Vorcharakterisierung der c_1^- Mutanten

2.1. Enzymatische Tests

An den c_1^- Mutanten wurden Enzymtests durchgeführt, um einen etwaigen Block im Elektronenfluß des bc_1 -Komplexes festzustellen. Die enzymatischen Aktivitäten der Succinat-Cytochrom-c-Oxido-Reduktase und der Cytochrom-c-Oxidase sind in μmol Substrat pro Minute per mg Protein angegeben und wurden bei 23°C gemessen (vgl. Methoden II 13.).

Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefaßt und zeigen,

daß die Oxidaseaktivität der Mutanten nahezu der des Wildtyps entspricht. Die Messungen der Succinat-Cytochrom-c-Oxido-Reduktase (SDH) weisen gegenüber dem Wildtyp eine geringe Restaktivität von ~1% auf.

Mutanten	Succinat-Cytochrom-c-Oxido-Reduktase	Cytochrom-c-Oxidase
Komplementationsgruppe I		
1302	0.0013	0.21
3101	0.0011	0.69
0802	0.0013	0.39
Komplementationsgruppe II		
1925	0.0003	0.22
Komplementationsgruppe III		
0101	0.00168	0.304
1165	0.00175	0.56
005	0.0034	0.29
2006	0.0005	0.17
2024	0.00025	0.43
Wildtyp	0.12	0.42

Tabelle 5 : Enzymteste (spezifische Enzymaktivität angegeben in μmol Substrat pro Minute per mg Protein bei 23°C)

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß alle c_1^- Mutanten, die neben geringer Atmungsaktivität kein Cytochrom c_1 aufweisen, in 3 Komplementationsgruppen fallen und einen enzymatischen Block im bc_1 -Komplex haben.

3. Wirkung der Mutationen auf die Bildung von Apocytochrom c_1

Allen c_1^- Mutanten der Komplementationsgruppe I, II und III fehlt die charakteristische Absorptionsbande des Cytochroms c_1 , d.h., das Holocytochrom c_1 wird nicht mehr gebildet. (Coenzym und Apoprotein bilden zusammen das aktive Holoenzym). Wird das Apoprotein dieses Cytochroms noch gebildet? Wenn Apocytochrom c_1 noch in den Mutanten synthetisiert wird, in welcher Form liegt es vor? Können Polypeptidhomologe von Cytochrom c_1 nachgewiesen werden?

Diese Fragen sind am besten durch immunologische Methoden zu beantworten. Ein spezifisches Antiserum gegen Cytochrom c_1 wurde in der Arbeitsgruppe Schatz (Biozentrum-Basel) isoliert und stand für die folgenden Untersuchungen zur Verfügung. Aus der Vielzahl der mitochondrialen Proteine lassen sich durch Immunreaktion sowohl Apoprotein c_1 als auch Cytochrom c_1 verwandte Polypeptide isolieren.

3.1. Immunologische Untersuchungen aller c_1^- Mutanten unter "steady state" Bedingungen

("steady state" Bedingungen, d.h., die tatsächlich vorhandenen Mengen an jeweiligen Polypeptiden zum Zeitpunkt der Isolation werden ermittelt).

Zur Untersuchung der Mutanten bot sich eine Methode von Towbin et al. (1979) an, die für diese Fragestellung modifiziert wurde (vgl. Methoden II 7.1.). Die in SDS gelösten Mutantensphaeroplasten werden in 12,5% SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt, und die aufgetrennten Polypeptidbanden elektrophoretisch auf Nitrozellulosepapier transferiert.

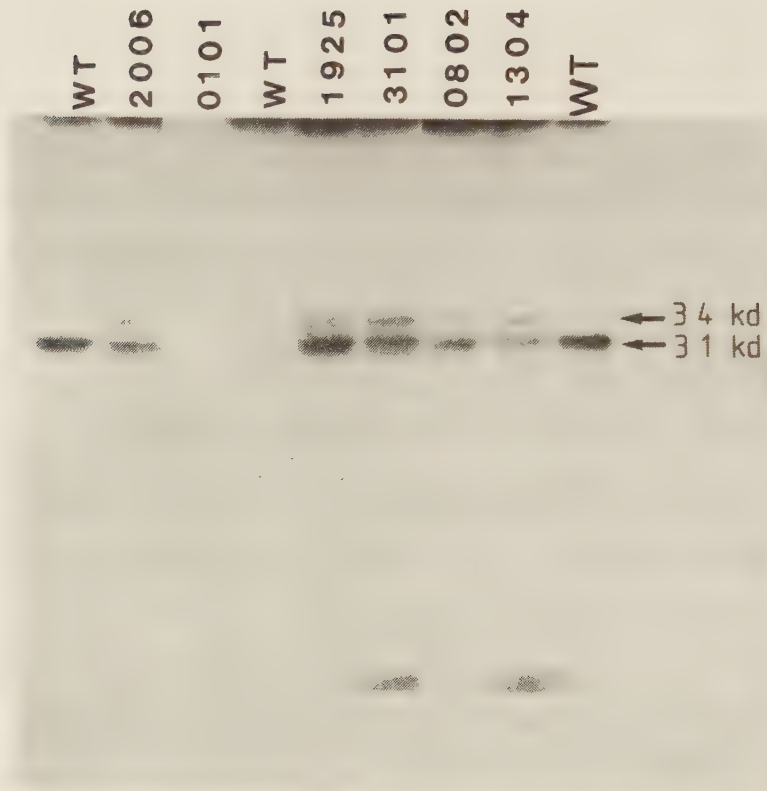


Abb.3 Nachweis des Cytochrom c_1 -Apoproteins in Cytochrom c_1 -Mutanten unter "steady state" Bedingungen.

Sphaeroplasten der Mutanten werden in 20% SDS lysiert und das Zellhomogenat auf einem 12,5% SDS-Acrylamidgel fraktioniert. Nach elektrophoretischem Transfer auf Nitrozellulosepapier werden Cytochrom c_1 -Antigene nach Immunkomplexbildung mit ^{125}I markiertem Protein A durch Autoradiographie sichtbar. (vgl. Methoden II 7.1.)

WT= Wildtyp SM 11-6c

Das Replica wird zuerst mit spezifischen Cytochrom c_1 Antiserum behandelt und danach mit 125 Jod markiertem Protein A inkubiert. Das Antigen ist fest an das Nitrozellulosepapier gebunden, somit muß der Antikörper nur das Antigen binden, ohne ein makroskopisches Präzipitat zu bilden. Der an der Oberfläche der Nitrozellulosefolie gebildete Immunkomplex wird durch das jodierte Protein A "dekoriert" und durch Autoradiographie lokalisiert. Mit dieser Methode können vorhandene Cytochrom c_1 -Produkte unter "steady state" Bedingungen identifiziert werden. Als Molekulargewichtstandards dienten ein mit 125 Jod markierter bc_1 -Komplex sowie Carboanhydrase (MG 29 Kd) und Cytochrom c (MG 12,5 Kd).

In Abb. 3 ist das Ergebnis eines solchen Experiments dargestellt. Es zeigt die nach Immunreaktion mit Anti- c_1 -Serum und durch das radioaktive Protein A sichtbaren c_1 -Produkte.

Der direkte Vergleich mit den Molekulargewichtstandards erlaubte nach gelelektrophoretischer Mobilität im SDS-Gel, das als diskrete Bande sichtbare Wildtypprodukt als Apocytochrom c_1 mit dem Molekulargewicht 31 Kd zu identifizieren. Die Mutanten 3101, 0802, 1304, 1925, 2006 und 2024 akkumulieren neben dem Wildtypprotein noch ein Cytochrom c_1 -kreuzreagierendes Polypeptid von höherem Molekulargewicht (34 Kd). Die Mutante D101 zeigt kein nachweisbares c_1 -Produkt. Keine Mutante akkumulierte nur das 34 Kd Produkt allein oder zeigte ein c_1 -Fragment. Alle c_1^- Mutanten ließen sich unter "steady state" Bedingungen einem der drei identifizierten Phänotypen

zuordnen. Die erzielten Resultate lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Drei c_1^- Mutanten (0101, 005, 1165) der Komplementationsgruppe III enthalten kein Polypeptid, das mit Cytochrom c_1 -Antiserum kreuzreagiert (005, 1165 hier nicht gezeigt);
2. alle anderen c_1^- Mutanten der Komplementationsgruppe I, II und III akkumulieren neben dem Apocytochrom c_1 (MG 31 Kd) noch ein Cytochrom c_1 -kreuzreagierendes Polypeptid (MG 34 Kd).

Mit der gleichen Untersuchungsmethode wurden mit jeweiligen spezifischen Antisera alle c_1^- Mutanten nach Veränderungen anderer Untereinheiten des bc_1 -Komplexes untersucht; getestete Untereinheiten: "Core"-Protein (SU I : Core I (44 Kd) , SU II : Core II (40 Kd), SU III : Cytochrom b (30 Kd), SU V : "Rieske"-Protein (25 Kd) und SU VI (17 Kd)). Diese Untersuchungen sollten klären ob die Mutation nur die Biogenese des Cytochroms c_1 , oder auch zusätzlich die anderer Untereinheiten des bc_1 -Segments beeinflusst. Die Ergebnisse dieser Experimente sind der nachfolgenden Tabelle 6 zu entnehmen und zeigen, daß fast alle c_1^- Mutanten die oben erwähnten Polypeptide akkumulieren. Als Ausnahme lassen 2 Mutanten das Fehlen einer Untereinheit erkennen.

3.2. Immunologischer Nachweis des Apocytochroms c_1 nach Pulsmarkierung an ganzen Zellen

Drei c_1^- Mutanten zeigen im "steady state" kein Cytochrom c_1 -Produkt. Sechs c_1^- Mutanten akkumulieren neben dem Wildtyp-Cytochrom c_1 ein 34 Kd Polypeptid. Diese Ergebnisse werfen

c ₁ ⁻ Mutanten	Core I	Core II	Cytochrom b	SU V	SU VI
3101	+	+	+	+	+
0802	+	+	+	+	([±])
1304	+	+	+	+	([±])
1925	([±])	+	([±])	+	-
0101	+	+	+	-	+
005	+	+	+	+	+
1165	+	+	+	+	+
2006	+	+	+	+	+
2024	+	+	+	+	([±])

([±]) nicht eindeutig zu identifizieren

Tabelle 6 : Untersuchungen der c₁⁻ Mutanten nach Defekten in Untereinheiten des bc₁-Komplexes.

folgende Fragen auf:

1. Bedeutet das Fehlen von Cytochrom c₁ in den 3 Mutanten eine blockierte Synthese oder einen beschleunigten Abbau des Cytochroms?
2. Wird Cytochrom c₁ vielleicht gar nicht in den bc₁-Komplex eingebaut?
3. Ist das 34 Kd Cytochrom c₁-kreuzreagierende Polypeptid ein Vorläufer des Apocytochroms c₁?

Diese Fragen lassen sich klären, wenn man die Mutantenzellen mit radioaktiven Aminosäuren markiert, solubilisiert und

mit c_1 -Antikörpern immunpräzipitiert. Im Gegensatz zu der vorher beschriebenen Methode können in diesem Versuchsansatz, bei entsprechend gewählter Markierungszeit selektiv neusynthetisierte Cytochrom c_1 -Polypeptide markiert und in ihrer "Reifung" verfolgt werden.

Die zu untersuchenden, karyotischen c_1^- Mutanten müssen zum Nachweis cytoplasmatisch synthetisierter Cytochrom c_1^- - Polypeptide homogen - ohne Hemmstoff - markiert werden. Es ist dadurch nicht möglich - analog zu den Cytochrom b-Mutanten (Haid et al., 1979) - durch Zugabe von CHX mitochondriale Translationsprodukte anzureichern und nachzuweisen. Aus der Vielzahl der nach homogener Markierung vorhandenen, radioaktiven Proteine ist eine Identifizierung von Cytochrom c_1^- homologen Polypeptiden nur durch eine Immunpräzipitation mit spezifischem Anti- c_1 -Serum gegeben. Für diesen Versuchsansatz konnten Markierungsbedingungen entwickelt werden, die zum optimalen Einbau an ^{35}S -Methionin in der frühen logarithmischen Wachstumsphase der c_1^- Mutanten führten (vgl. Methoden II 5.1.).

Ross & Schatz (1976) stellten bei der Isolierung von Cytochrom c_1 seine starke Proteolyseempfindlichkeit fest. Um dieses Problem zu umgehen, wurden die markierten Zellen nach einer von Ohashi (unveröffentlicht) entwickelten Methode aufgeschlossen. Nach Pulsmarkierung von ganzen Zellen mit ^{35}S -Metionin wurden diese sofort mit Trichloressigsäure (TCA, Endkonzentration 20%) denaturiert und durch Schütteln mit Glasperlen aufgeschlossen. Die TCA-behandelten, markierten Zellhomogenate wurden neutralisiert und in Gegen-

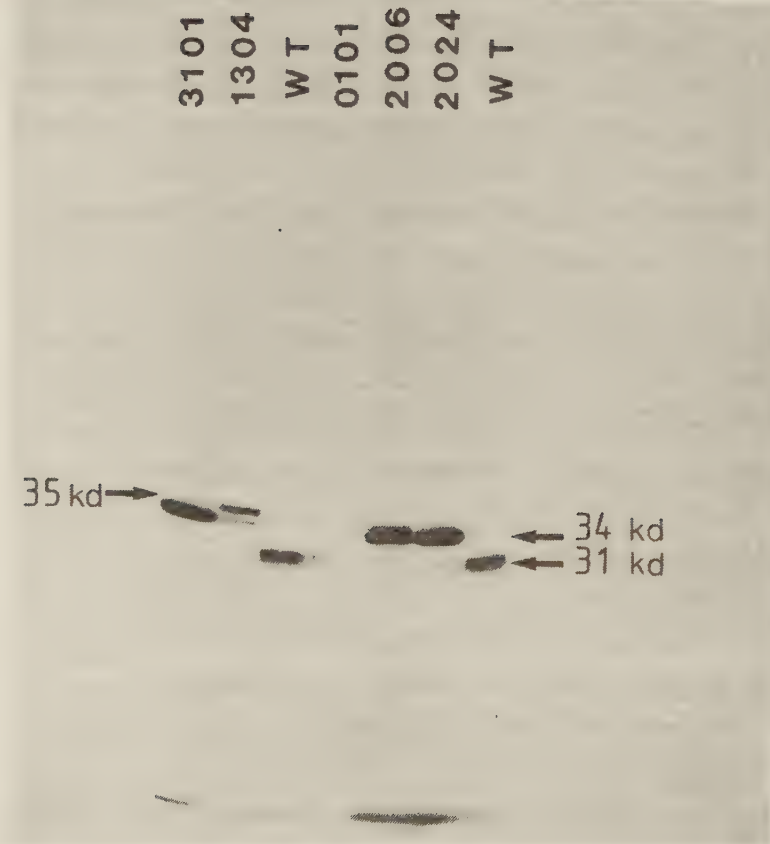


Abb.4 Immunologische Identifizierung von Cytochrom c_1 -
Homologen in Cytochrom c_1 Mutanten.

Nach Pulsmarkierung (3 Stunden) mit ^{35}S - Methionin werden die Hefezellen wie in Methoden II 7.2. beschrieben mit TCA behandelt und das in TNET-Puffer gelöste Präzipitat mit Cytochrom c_1 -Antiserum und Staphylococcus aureus Membranprotein A inkubiert. Die Immunpräzipitate werden in 12.5% SDS-Acrylamidgelen aufgetrennt und autoradiographisch sichtbar gemacht.

WT bezeichnet den Wildtyp, 3101 und 1304 sind Mutanten der Komplementationsgruppe I, 0101, 2006 und 2024 Mutanten der Komplementationsgruppe III.

wart von Proteaseinhibitoren (PMSF/TLCK) zuerst mit Anti- c_1 -Serum und dann mit fixierten Staphylococcus aureus Zellen inkubiert. Das an der Oberfläche dieser Bakterien befindliche Protein A bindet spezifisch Immunglobuline der IgG-Klasse, die an den Bakterien adsorbieren. Immunkomplexe können somit leicht durch Zentrifugation von nicht reagierenden Proteinen getrennt werden (vgl. Methoden II 7.2.). Die so erhaltenen radioaktiven Immunpräzipitate werden in SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und durch Fluographie analysiert (vgl. Methoden II 6.). Die Abb. 4 veranschaulicht das Ergebnis eines solchen Experiments. Nach der Wanderungsgeschwindigkeit im SDS-Gel treten 3 verschiedene, mit dem Anti- c_1 -Serum kreuzreagierende Cytochrom c_1 -Produkte auf:

1. das Wildtyp-Cytochrom c_1 -Protein (31 Kd),
2. in den Mutanten 3101, 1304, 2006 und 2024 das schon unter "steady state" Bedingungen identifizierte 34 Kd Polypeptid,
3. ein weiteres, höher-molekulares Produkt (35 Kd), welches in der Mutante 1304 akkumuliert.

In Übereinstimmung mit den "steady state" Untersuchungen zeigt die Mutante 0101 auch nach Pulsmarkierung kein Cytochrom c_1 -Produkt wie auch die Mutante 005 und 1165 (hier nicht gezeigt), d.h., Cytochrom c_1 wird offenbar nicht synthetisiert.

Vergleicht man die Resultate der durchgeführten Experimente miteinander, so lassen sich nach Immunantwort mit dem Anti- c_1 -Serum das Apocytochrom c_1 (31 Kd) identifizieren sowie

zwei höher-molekulare (34 Kd und 35 Kd) Polypeptide, die damit ihre immunologische Verwandtschaft zum Cytochrom c_1 aufzeigen. Um zu erhärten, daß die Proteine wirklich verwandt sind, d.h., daß es sich z.B. nicht um Kontaminationen oder um ein "Fremdprotein" mit gleichen antigenen Determinaten handelt, wurden die folgenden Experimente durchgeführt.

4. Nachweis der Strukturverwandtschaft der identifizierten Cytochrom c_1 -Produkte

Die Analyse der ein-dimensionalen proteolytischen "fingerprints" dient im vorliegenden Fall zum Nachweis der Homologie zwischen dem Wildtyp-Apocytochrom c_1 und dem in den c_1 Mutanten nachgewiesenen 34 Kd Produkt. Zu vergleichende Polypeptidbanden wurden nach Immunpräzipitation und Elektrophorese aus dem SDS-Polyacrylamid-Gel herausgeschnitten und nach Proteasebehandlung in einem zweiten Gel aufgetrennt (Cleveland, 1977) (vgl. Methoden II 8.).

Aus Abb. 5 und Abb. 6 geht hervor, daß das in der Mutante 2006 auftretende 34 Kd Polypeptid und das Wildtyp-Apocytochrom c_1 nach begrenzter Proteolyse mit Naragase und Staphylococcus aureus V 8 Enzym fast identische Verdauungsmuster aufzeigen. Dies läßt den Schluß zu, daß die Polypeptide in ihrer Primärstruktur weitgehend identisch sind.

Eine zusätzliche Bestätigung und eine gleichfalls vorhandene Homologie mit dem 35 Kd Polypeptid konnte durch zwei-dimensionale proteolytische "fingerprints" nachgewiesen werden, die in einem anderen Zusammenhang noch ausführlich dargestellt werden.

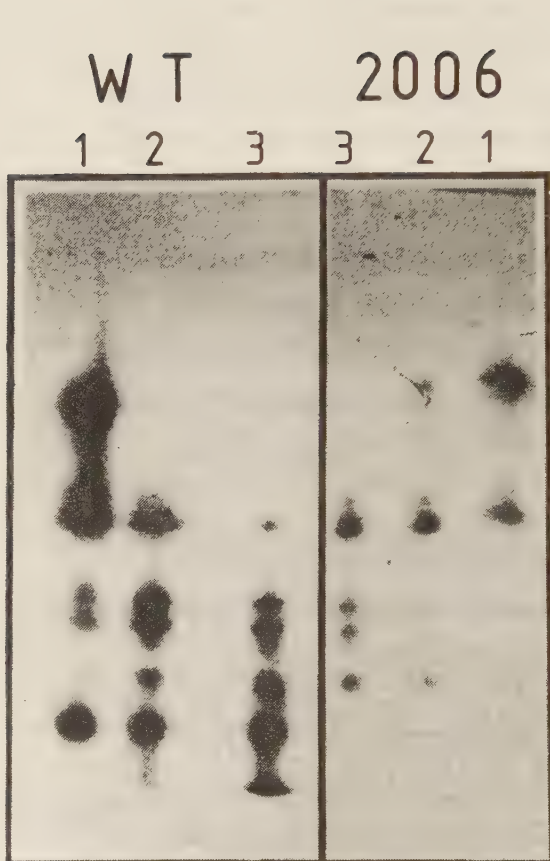


Abb. 5

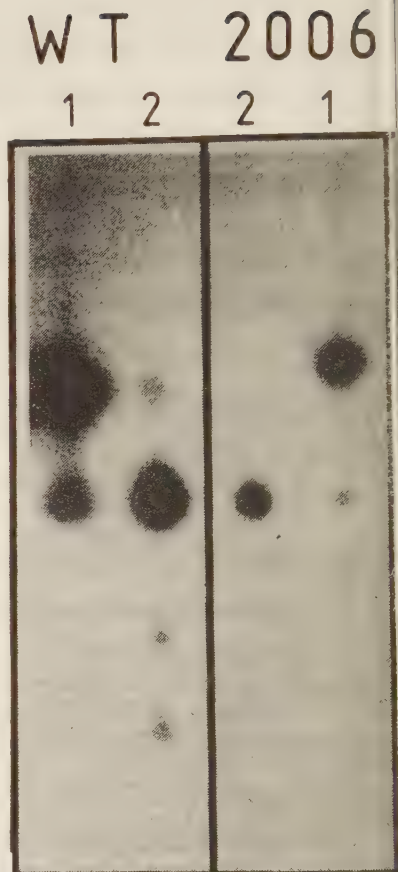


Abb. 6

Abb. 5 und Abb. 6

Vergleich der Fragmentierungsmuster nach begrenzter Proteolyse der Wildtyp Apocytochrom c_1 -Form (31 Kd) und des Cytochrom c_1 -Polypeptids (34 Kd) der Mutante 2006.

Abb. 5 eingesetzte Protease : Naragase , Nr.1= 1ng, Nr.2= 10 ng, Nr.3 = 100ng

Abb. 6 Nr.1 = 1 ng, Nr. 2 = 10 ng der Protease Staphylococcus aureus V 8

Zusammenfassend ist zu sagen, daß die " neu " identifizierten 34 Kd Polypeptide neben der Kreuzreaktion mit Anti- c_1 -Serum auch homologe Aminosäuresequenzen aufweisen und daher eindeutig Cytochrom c_1 verwandte Polypeptide sind.

Frühere Arbeiten der Gruppe Schatz haben gezeigt, daß die meisten der mitochondrialen Polypeptide, von Kerngenen codiert an cytoplasmatischen Ribosomen als größere Precursoren synthetisiert werden, die dann in die Organellen transportiert und zu ihrer reifen Form umgewandelt werden.

Somit tritt folgende Frage auf: sind die 34 Kd und 35 Kd-Polypeptide Vorstufen des Apocytochroms c_1 ?

Bei Saccharomyces cerevisiae werden 3 der 4 cytoplasmatischen Cytochrom-c-Oxidase Untereinheiten (SU IV, SU V und SU VI) (Lewin et al., 1979) jeweils als Precursoren gebildet, die nur wenige tausend Daltons größer sind als die korrespondierenden reifen Untereinheiten. Côté et al. (1979) zeigten, daß auch Untereinheit V des bc_1 -Komplexes und Cytochrom c_1 (Nelson & Schatz, 1979) als größere Polypeptide synthetisiert werden. Somit lag die Vermutung nahe, daß das größte der identifizierten Cytochrom c_1 -Polypeptide das primäre Translationsprodukt darstellt, oder diesem zumindest näher steht als das funktionelle c_1 .

Um ein Precursorpolypeptid nachweisen zu können, mußten Versuchsbedingungen geschaffen werden, in denen der Transport der Precursoren ins Mitochondrium blockiert wird.

Nelson & Schatz (1979) konnten in intakten Hefezellen zeigen, daß CCCP (Carbonyl-cyanid-m-Chlorophenylhydrazon) die

Umwandlung verschiedener mitochondrialer Precursorproteine blockiert. CCCP ist ein Entkoppler der oxydativen Phosphorylierung, der den ATP-Spiegel in Mitochondrien stark reduziert. In Gegenwart dieses Entkopplers akkumulierte - in den zitierten Versuchen - in Hefezellen ein höhermolekulares Cytochrom c_1 -kreuzreagierendes Polypeptid, welches mit dem in vitro synthetisierten Apocytochrom c_1 -Precursor im SDS-Gel komigrierte.

5. Identifizierung des Cytochrom c_1 -Precursorpolypeptids in Gegenwart des Entkopplers CCCP

Nach der von Nelson & Schatz (1979) ausgearbeiteten Methode wurden Sphaeroplasten von c_1^- Mutanten, die das 34 Kd Polypeptid akkumulieren, mit ^{35}S -Methionin in An- oder Abwesenheit von CCCP pulsmarkiert (vgl. Methoden II 5.3.). Das Ergebnis nach anschließender Immunpräzipitation und Auftrennung der Präzipitate im SDS-Gel zeigt Abb. 7. In Gegenwart des Entkopplers CCCP akkumuliert beim Wildtyp anstelle des 31 Kd Polypeptids hauptsächlich das 35 Kd Peptid; in der Mutante 2006 tritt anstelle des 34 Kd Proteins ausschließlich das 35 Kd Polypeptid auf. Das in Wildtyp- und Mutantenzellen identifizierte 35 Kd Polypeptid komigriert im SDS-Gel mit dem primären Translationsprodukt des Cytochroms c_1 in vitro. Diese gleiche Mobilität identifiziert das 35 Kd Polypeptid als identisch mit dem in vitro Vorläufer (Precursor)-Polypeptid von Cytochrom c_1 .

Alle c_1^- Mutanten zeigten in Gegenwart von CCCP eine Akkumulierung dieses Cytochrom c_1 -Precursors und bestätigten somit selbige Zuordnung (hier nicht gezeigt).

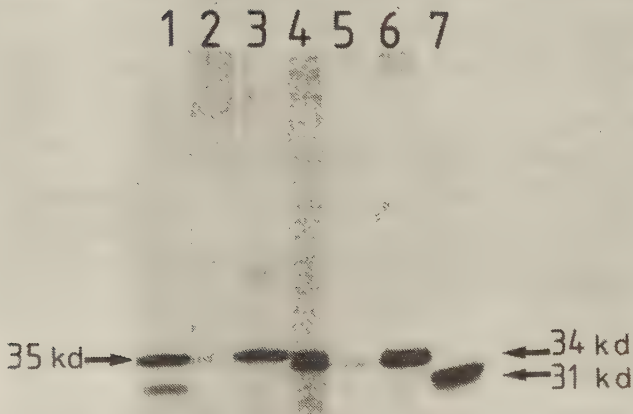


Abb. 7 Spezifische Markierungen mit ^{35}S -Methionin von Cytochrom c_1 -Homologen an ganzen Zellen oder Sphaeroplasten und anschließender Immunpräzipitation mit Anti- c_1 -Serum.

20 Minuten Pulsmarkierung von Sphaeroplasten in Gegenwart von CCCP,

Nr. 1 = Wildtyp + CCCP

Nr. 2 = Kontrolle: primäres Cytochrom c_1 -Translationsprodukt in vitro

Nr. 3 = Mutante 2006 + CCCP

Nr. 4 = Mutante 2006 nach 20 Min. Pulsmarkierung ohne CCCP

Kontrollen: 3 Stunden Pulsmarkierung an ganzen Zellen ohne CCCP
Nr. 5 = Cytochrom c_1 -Produkt (34 Kd) der hämdefizienten Mutante GL1

Nr. 6 = Mutante 2006

Nr. 7 = Wildtyp

Die Markierungsbedingungen in Gegenwart von CCCP sind dem Methodenteil II 5.3. zu entnehmen, die der Immunpräzipitation II 7.2.

Das 34 Kd Polypeptid, welches in den c_1^- Mutanten sowohl im "steady state" als auch nach Pulsmarkierungsexperimenten akkumuliert, ist somit nicht das primäre Translationsprodukt. Es scheint eine Zwischenstufe im Processing von Cytochrom c_1 zu sein. Diese Vermutung lag nahe, da diese drei Cytochrom c_1 -Polypeptide (35 Kd, 34 Kd, 31 Kd) auch in WT/ ρ^+ , ρ^- und hämdefizienten Mutanten eindeutig nachgewiesen werden konnten (Ohashi, unveröffentlicht).

6. Ein Modell für das Processing des Cytochroms c_1

Aus den vorher beschriebenen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß offensichtlich verschiedene Processingschritte an der Bildung des Holoenzym c_1 beteiligt sind.

In der Arbeitsgruppe Schatz wurden für die 3 identifizierten Cytochrom c_1 -Polypeptide folgende Bezeichnungen als Arbeitshypothese abgeleitet:

c_1 -precursor form	= P (35 Kd)
c_1 -intermediate form	= I (34 Kd)
c_1 -mature form	= M (31 Kd)

Für die Reifung des Cytochroms c_1 wurde das Modell eines Mehrstufenprozesses von P über I zu M entwickelt. Diese Nomenklatur auf die vorliegenden Ergebnisse angewandt ergibt, in den nach Komplementationsgruppen geordneten c_1^- Mutanten, folgendes Bild für Cytochrom c_1 (Tabelle 7):

Versuchs- bedingungen	Komplementationsgruppen		
	I	II	III
"steady state"	I + M	I + M	I + M
Pulsmarkierung	P + I	I	P + I
Markierung in Gegenwart von CCCP	P	P	P

Tabelle 7 : Identifizierte Cytochrom c_1 Formen in c_1^- Mutanten der drei Komplementationsgruppen.

Nach Interpretation der dargestellten Befunde scheinen manche c_1^- Mutanten einen Defekt in einem der Reifungsschritte von Cytochrom c_1 zu haben. Das heißt, die Mutation in den c_1^- Mutanten, die I akkumulieren, könnten den Processingschritt vom intermediären zum reifen Cytochrom c_1 blockieren.

Das aufgestellte Modell des Mehrstufenprozesses von Cytochrom c_1 beruht auf der Identifikation dreier verschiedener Polypeptide, die neben der Kreuzreaktion mit Anti- c_1 -Serum auch weitere Strukturverwandtschaft aufzeigen. Diese Ergebnisse können allerdings nicht beweisen, daß die identifizierte I-Form eine wirkliche Zwischenstufe des Processings von Cytochrom c_1 darstellt.

Ergebnisse der Gruppe Schatz konnten jedoch diese Vermutung bestätigen:

1. Jane Gibson (unveröffentlicht) zeigte in einem Pulse-Chase-Experiment an Wildtyp/ ρ^+ Zellen, daß die zuerst

in der P-Form gefundenen Radioaktivität nach verschiedenen Zeiten über I nach M "gechased" werden konnte.

2. Akira Ohashi (unveröffentlicht) markierte die hämdefiziente Mutante Gl-1 mit ^{35}S -Methionin und fand lediglich die I-Form. Bei einem nachfolgenden "Chase" mit unmarkiertem Methionin in Gegenwart von Häm konnte die I-Form zur reifen M-Form prozessiert werden. In Abwesenheit von Häm war die I-Form stabil.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß der Processingschritt von I zu M hämabhängig ist. Unklar bleibt jedoch, ob die Hämabhängigkeit gleichzeitig gekoppelt ist mit der kovalenten Anheftung von Häm an die I-Form, oder ob Häm erst an die reife M-Form gebunden wird.

Somit konnten zu dem "Processing Modell" von Cytochrom c_1 zwei Hypothesen aufgestellt werden:

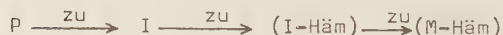
Hypothese I

Holocytochrom c_1 wird prozessiert von



Hypothese II

Holocytochrom c_1 wird prozessiert von



Zur Bestätigung einer der beiden Hypothesen waren weder Untersuchungen am Wildtyp noch an der hämdefizienten Mutante möglich, da die "steady state" Konzentrationen der I-Form

in beiden Organismen zu gering ist, um kovalent gebundenes Häm z.B. durch radioaktiv markiertes Eisen nachzuweisen (Gibson, persönliche Mitteilung).

Zur Überprüfung dieser Hypothesen eigneten sich ganz besonders diejenigen c_1^- Mutanten, die unter "steady state" Bedingungen die I-Form akkumulieren.

7. Nachweis der kovalent gebundenen Hämgruppe an Cytochrom c_1 -Polypeptiden in c_1^- Mutanten

Thomas et al. (1976) beschrieben eine "Färbe-Methode", in der Tetramethylbenzidin als Reagenz benutzt wird, um die Peroxidaseaktivität von Häm und Hämproteinen in SDS-Gelen nachzuweisen. Diese Technik ermöglicht, kovalent gebundenes Häm im SDS-Gel anzufärben und somit sichtbar zu machen. (Nicht kovalent gebundenes Häm wird durch SDS aus Proteinen freigesetzt und wandert mit freien SDS-Mizellen). Um ausreichende Mengen an Cytochrom c_1 zu erhalten, wurden Mitochondrien von denjenigen c_1^- Mutanten isoliert, welche die I-Form akkumulieren. Die Polypeptide der mit SDS dissoziierten Mitochondrien werden in 17,5% SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt. Nach Behandlung der Gele mit Tetramethylbenzidin und H_2O_2 konnten die hämtragenden Proteine als angefärbte Banden identifiziert werden (vgl. Methoden II 10.) Da nur kovalent gebundenes Häm in SDS-Gelen nachgewiesen werden kann, sollten nur Cytochrom c_1 Proteine und Cytochrom c anfärbbar sein. Abb. 8a zeigt das Ergebnis eines solchen Experimentes. In Wildtypmitochondrien ist Cytochrom c_1 als hämtragende M-Form durch Benzidin anfärbbar, ebenso in den Mutanten 3101 und 2006. Die Mutante 2006 zeigt zudem eine



Abb. 8 Nachweis von Häm an Cytochrom c_1 -Polypeptiden (I- und M-Formen) durch Anfärbung mit Tetramethylbenzidin.

a) Im 17,5% SDS-Acrylamidgel wird 400 μ g Mitochondrienprotein der Mutanten 2006 und 3101 sowie des Wildtyps aufgetrennt. Mit Tetramethylbenzidin werden hämtragende Proteine im Gel angefärbt. (vgl. Methoden II 10.)

Nr. 1 = Wildtyp, Nr. 2 = Mutante 2006, Nr. 3 = Mutante 3101
* = Cytochrom c

I = angefärbte Cytochrom c_1 I-Form (34 Kd)

M = angefärbte Cytochrom c_1 M-Form (31 Kd)

b) Aus dem benzidinbehandelten Gel werden die Mitochondrienproteine elektrophoretisch auf Nitrozellulosefolie transferiert. Dieses Replica wird mit Anti- c_1 -Serum und jodiertem Protein A inkubiert und Cytochrom c_1 -Antigene autoradiographisch sichtbar gemacht.

Nr. 1 = Wildtyp (M-Form), Nr. 2 = Mutante 2006 (I- und M-Form), Nr. 3 = Mutante 3101 (I- und M-Form)

Die niedermolekulare Bande ist ein häufig auftretendes Cytochrom c_1 -Degradationsprodukt.

gefärbte, somit hämtragende I-Form, wohingegen in der Mutante 3101 die I-Form wohl immunologisch nachweisbar, nicht aber mit Benzidin anzufärben ist. Die niedermolekularen gefärbten Banden repräsentieren Cytochrom c.

Da sich auch beim Wildtyp eine ganz schwache I-Bande anfärben ließ, sollte eine Erklärung für das Fehlen dieser Bande in der Mutante 3101 gefunden werden. Eine Möglichkeit wäre, daß zu wenig mitochondriales Protein eingesetzt worden war, da diese "Färbe-Methode" zum Nachweis geringer Hämkonzentrationen nicht sensitiv genug ist.

Der elektrophoretische Transfer der Proteine aus dem benzidingefärbten Gel auf Nitrozellulosepapier und die anschließende Inkubation des Replicas mit Anti-c₁-Serum konnte diese Frage klären (vgl. Methoden II 7.1.). Das Ergebnis ist in Abb. 8b dargestellt. Das Immunreplica zeigt, daß im SDS-Gel eine ausreichende Proteinmenge der I-Form der Mutante 3101 vorhanden war, um mit Benzidin zu reagieren. Da somit diese Reaktion nicht stattfand, ist in der Mutante 3101 keine kovalent gebundene Hämgruppe an der I-Form nachzuweisen. Möglicherweise ist diese Mutante in der Anheftung des Häms an die I-Form defekt.

Der Sachverhalt, daß Häm an der I-Form gebunden vorliegt, spricht für die Hypothese II. Da im Wildtyp und allen c₁⁻ Mutanten das reife c₁ Produkt stets Häm trägt, kann dagegen Hypothese I ausgeschlossen werden. Zu ihrer Bestätigung hätten auch die M-Formen ohne Häm auftreten müssen.

Eine weitere Stützung der Hypothese II erbringen die in Abb. 8 dargestellten Resultate. Sie zeigen eindeutig, daß das

intermediäre c_1 Produkt des Wildtyps und der Mutante 2006 eine kovalent gebundene Hämgruppe tragen.

Die Hämabhängigkeit des Processings von I zu M und das Anheften des Häms an I können unter Umständen zwei verschiedene Vorgänge sein.

8. Genetische Fragestellungen zur Reifung von Cytochrom c_1

Wieviele Gene können die Reifung von Cytochrom c_1 beeinflussen? Neben dem Strukturgen für Cytochrom c_1 sollten Gene beteiligt sein, welche die folgenden Enzyme determinieren:

- a) eine Matrix-Protease, die P zu I prozessiert (Böhni et al., 1980, vgl. Diskussion),
- b) ein Enzym, welches für die Anheftung von Häm an die I-Form verantwortlich ist,
- c) ein Enzym, welches die (vermutlich proteolytische) Bildung der hämhaltigen M-Form katalysiert.

Nach vorher beschriebenen Untersuchungen können folgende durch Mutation bedingte Veränderungen in den Cytochrom c_1^- Mutanten ausgeschlossen werden:

1. ein Defekt in der Hämbiosynthese, da die c_1^- Mutanten noch die Cytochrome b, aa_3 und c enthalten,
2. ein Fehler der Matrix-Protease (Böhni et al., 1980); die Umwandlung von P zu I ist in keiner Mutante verhindert.

Eine Mutation des Strukturgens für Cytochrom c_1 könnte in den 3 Mutanten 0101, 005 und 1165 vorliegen, da diese kein Cytochrom c_1 akkumulieren. Alle anderen Mutanten zeigen den gleichen Cytochrom c_1^- Phänotyp, d.h., sie akkumulieren neben

der M-Form auch beträchtliche Mengen der I-Form.

In diesen c_1^- Mutanten könnte entweder ein prozessierendes Enzym verändert sein (d.h., es wären regulatorische Mutanten), oder das Cytochrom c_1 -Polypeptid ist so verändert, daß es nur sehr langsam von der I- in die M-Form umgewandelt werden kann (d.h., es wären Strukturgen-Mutanten).

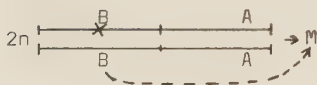
Um zwischen einem Strukturgendefekt und einem Defekt irgendeiner Reifungsaktivität in diesen Mutanten zu unterscheiden, wurde die Expression der einzelnen Cytochrom c_1 -Mutationen in heterozygoten, diploiden Zellen untersucht, die durch Kreuzung der Mutanten mit Wildtypzellen entstanden.

Die nachfolgende schematische Darstellung zeigt die Logik dieses Experimentes.

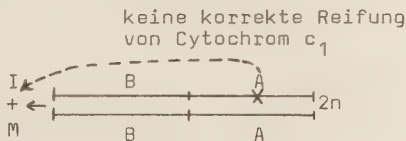
Enzymatischer Defekt

Strukturgendefekt

c_1 - Phänotyp



enzymatischer Defekt wird komplementiert



A = Strukturgen c_1

B = Gen für ein Processing-Enzym

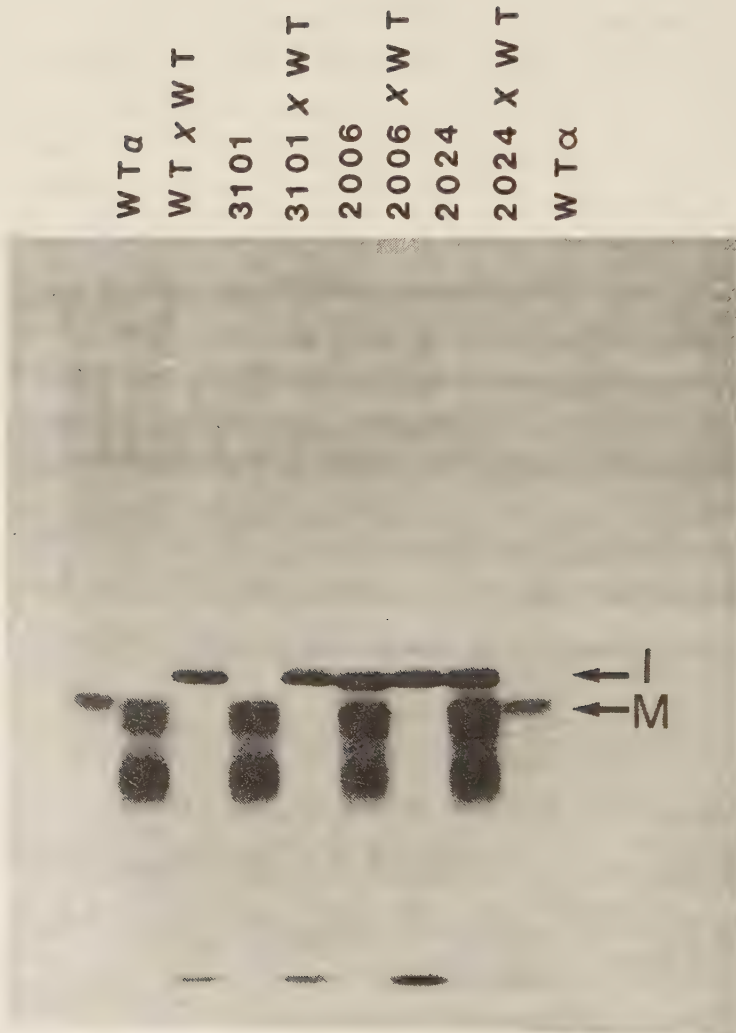


Abb. 9 Vergleich der Cytochrom c_1 -Produkte in haploiden Mutanten und heterozygoten Diploiden.

Haploide und diploide Zellen (nach Kreuzung der Mutanten mit den α und α Wildtypstämmen) werden 3 Stunden mit ^{35}S -Methionin markiert und wie unter Abb. 4 beschrieben analysiert.

I bezeichnet die I-Form { 34 Kd }
M bezeichnet die M-Form { 31 Kd }

WT = Wildtyp

Die Mutante 3101 ist ein Repräsentant der Komplementationsgruppe I, die Mutanten 2006 und 2024 sind der Gruppe III zugeordnet.

Ein enzymatischer Defekt in einer der c_1^- Mutanten, die I akkumulieren, müßte im diploiden Zustand komplementierbar sein, da der Wildtyp ein funktionsfähiges Reifungsenzym bildet. In einer diploiden Zelle würde bei einem Strukturgendefekt nur das Cytochrom c_1 -Produkt des intakten Gens korrekt prozessiert werden.

Ausgehend von diesen Überlegungen wurden alle c_1^- Mutanten, die I akkumulieren, mit ^{35}S -Methionin markiert, mit Anti- c_1 -Serum immunpräzipitiert und das Bandenmuster im SDS-Polyacrylamid-Gel nach Autoradiographie analysiert (vgl. Methoden II 5.1., 7.2.).

Abb. 9 zeigt das Ergebnis eines solchen Experimentes. Die Mutante 3101 (Komplementationsgruppe I) akkumuliert nur im haploiden Zustand die I-Form und bildet als Diploide nur die M-Form. Die Mutanten 2006 und 2024 (Komplementationsgruppe III) akkumulieren die I-Form sowohl im haploiden als auch im diploiden Zustand. Bei allen c_1^- Mutanten der Komplementationsgruppe I und II konnte sowohl nach Pulsmarkierung als auch nach "steady state" Bedingungen (Filtertransfermethode) nur noch die reife M-Form in den Diploiden nachgewiesen werden (hier nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu zeigen die Mutanten 2006 und 2024 der Komplementationsgruppe III das selbe Bandenmuster wie im haploiden Zustand.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß die Mutanten der Komplementationsgruppe I und II einen enzymatischen Defekt im Reifungsprozeß des Cytochroms c_1 haben müssen, der im diploiden Zustand komplementierbar ist. Die

Mutanten 2006 und 2024 der Komplementationgruppe III hingegen könnten einen Defekt im Strukturgen von Cytochrom c_1 tragen.

9. Zwei-dimensionale proteolytische "Fingerprints" zum Nachweis struktureller Veränderungen von Cytochrom c_1 Polypeptiden

Die Methode der zwei-dimensionalen proteolytischen "Fingerprints" kann sowohl Homologien als auch strukturelle Veränderungen der Primärsequenz eines Polypeptids aufzeigen. Nach einer proteolytischen Behandlung der zu identifizierenden Proteine mit Trypsin werden die radioaktiven Spaltprodukte auf einer Celluloseplatte in der ersten Dimension elektrophoretisch, in der zweiten Dimension chromatographisch getrennt. Das entstehende radioaktive Peptidmuster kann nach Autoradiographie analysiert werden (vgl. Methoden II 9.). Diese Methode ist im Gegensatz zur ein-dimensionalen Peptidkartierung (vgl. Ergebnisse II 4.) wesentlich sensitiver und aussagekräftiger. Neben dem Verwandtschaftsnachweis der P- und I-Form mit dem reifen Cytochrom c_1 wurde die Methode der zwei-dimensionalen Peptidkartierung angewandt, um etwaige Veränderungen von Aminosäuresequenzen in den Precursorformen sowie I-Formen der Strukturgenverdächtigen Mutanten nachzuweisen. Eine Mutante mit einem enzymatischen Defekt sollte weder in der P-Form noch in der I-Form Veränderungen gegenüber den entsprechenden Wildtypformen zeigen. Aus der Abb. 10 a-k ist zunächst ersichtlich, daß die Muster der ^{35}S -Methionin markierten P- und I-Formen weitgehend identisch sind und die Ergebnisse der ein-dimensionalen Peptidkartierung erhärten.

Bei den Mutanten 3101 und 1304 sind die "Fingerprints" der P- und I-Formen den entsprechenden Wildtyp-Formen sehr ähnlich (Abb. 10 a-f) . Die Mutanten 2006 und 2024 (Abb. 10 g-k) lassen im Peptidmuster ihrer P- und I-Formen geringfügige Veränderungen erkennen. Die Unterschiede sind aber zu gering, um klar mutative Veränderungen der P- und I-Formen zu belegen.

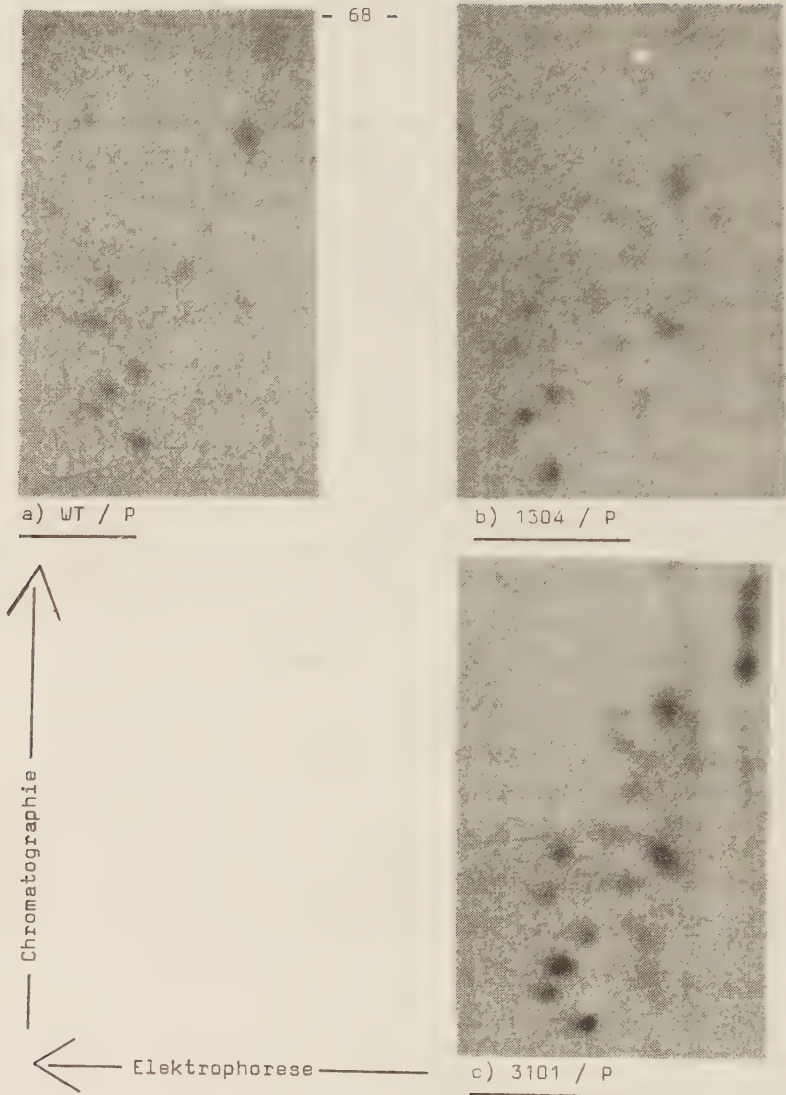


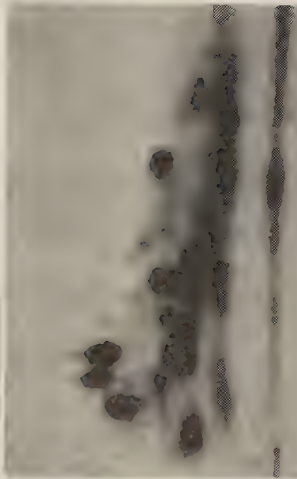
Abb. 10 a - k) Vergleich der Fragmentierungsmuster von
Cytochrom c_1 - Polypeptiden nach Trypsin-
spaltung und zwei-dimensionaler Auftrennung.
(vgl. Methoden II 9.)

1. Dimension = Elektrophorese, 2. Dimension = Chromatographie
I = intermediäres Cytochrom c_1 - Polypeptid (I-Form)
P = Precursor (P-Form) des Cytochroms c_1
WT = Wildtyp

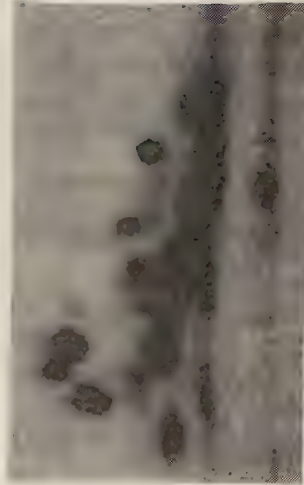
Chromatographie



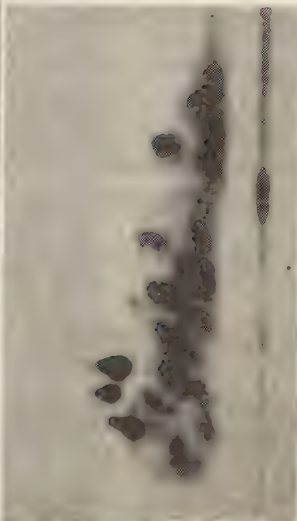
d) UT / I



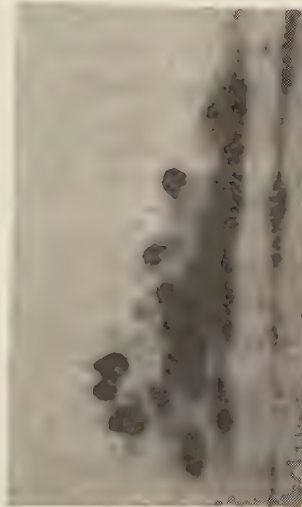
e) 1304 / I



f) 3101 / I

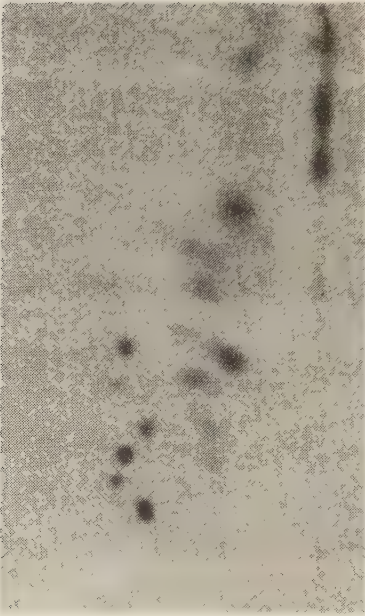


g) 2006 / I

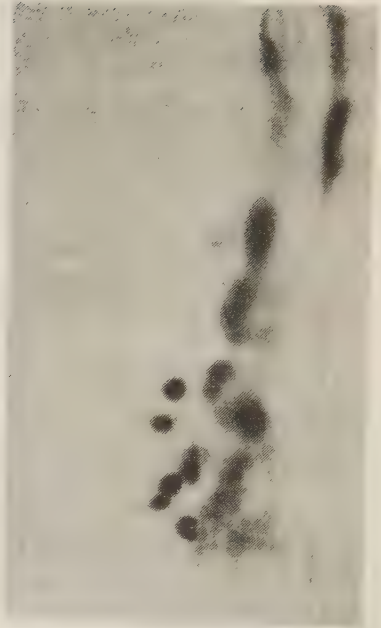


h) 2024 / I

Elektrophorese



i) WT / P



j) 2006 / P

Chromatographie ↑



k) 2024 / P

← Elektrophorese

10. In vitro Proteinsynthese

Einen deutlichen Hinweis auf einen Strukturgendefekt liefern die c_1 Mutanten 0101, 1165, 005, die in vivo kein Cytochrom c_1 -Polypeptid akkumulieren. Die bisher durchgeführten Experimente schließen allerdings nicht aus, daß diese Mutanten zuvor Cytochrom c_1 synthetisieren, es aber schnell wieder abbauen. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde mRNA der Mutanten in einem zellfreien Proteinsynthesesystem übersetzt und die Synthese des Cytochrom c_1 -Precursors (P-Form) immunologisch geprüft. In diesem System ist ein gegenüber dem Wildtyp beschleunigender Abbau eventuell gebildeter P-Formen unwahrscheinlich. Als Experimentiersystem diente das Kaninchen-Retikulozytenlysat, welches den notwendigen Translationsapparat besitzt und weitgehend frei von Proteasen ist. Um den spezifischen Codierungsgehalt der Mutanten mRNA zu bestimmen, muß die endogene RNS des Retikulozytenlysats zuerst zerstört werden. Dies wird durch Behandlung des Lysates mit bakterieller Nuclease erzielt, die man anschließend wieder inaktiviert (vgl. Methoden II 12.). Mutanten RNS kann somit ohne Degradationsgefahr hinzugefügt werden, so daß alle Proteine, die im Lysat synthetisiert werden, von der spezifischen Mutanten mRNA programmiert sind (Pelham & Kackson, 1976). Für die in vitro Translationsexperimente notwendige mRNA (gesamte cytoplasmatische RNS) wurde aus den Mutanten 005, 1165, 0101 und aus dem Wildtyp, wie unter Methoden II 11. beschrieben, isoliert und im Lysat in Gegenwart von ^{35}S -Methionin translatiert. Die Behandlung der Lysate ist im Methodenteil II 12. zu entnehmen. Um nach der

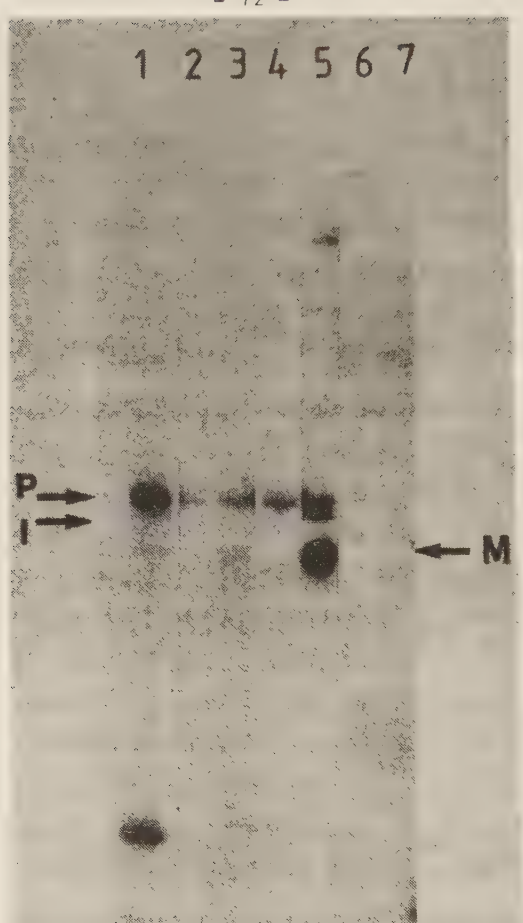


Abb. 11 In vitro Synthese von Apocytochrom c_1 in verschiedenen Cytochrom c_1 - Mutanten.

Nach in vitro Translation der Wildtyp - und Mutanten RNS im Retikulozytenlysat erfolgt die Immunpräzipitation mit Anti- c_1 - Serum zur Identifikation primärer Translationsprodukte. (Vgl. Methoden II 11. und 12.).

Nr. 1 = Wildtyp

Nr. 2 = Mutante 2006 { Komplementationsgruppe III }

Nr. 3 = Mutante 2024 { - gruppe III }

Nr. 4 = Mutante 3101 { - gruppe I }

Nr. 5 = Wildtypkontrolle : in vivo synthetisierte Cytochrom c_1 -
Formen : P , I , M

Nr. 6 = Mutante 0101 { - gruppe III }

Nr. 7 = Mutante 1165 { - gruppe III }

P = das primäre Translationsprodukt in vitro

I = die Cytochrom c_1 I - Form in vivo

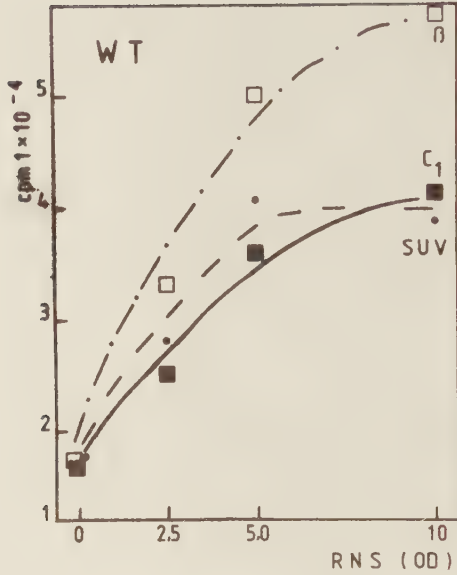
M = das reife Cytochrom c_1 - Produkt in vivo

in vitro Translation die neusynthetisierten radioaktiven Polypeptide zu identifizieren, werden spezifische Antiseren eingesetzt. Nach Immunpräzipitation (vgl. Methoden II 7.2.) und Gelelektrophorese können die in vitro synthetisierten spezifischen primären Translationsprodukte durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden. Abb. 11 zeigt ein Ergebnis eines solchen Experiments nach Immunpräzipitation mit Anti- c_1 - Serum. Der Wildtyp und die Mutanten 3101 und 2006 synthetisieren das bereits vorher beschriebene primäre Translationsprodukt (Nelson & Schatz, 1979). Die Mutanten 1165, 005 und 0101 lassen kein in vitro translatiertes Cytochrom c_1 -Polypeptid erkennen (005, hier nicht gezeigt).

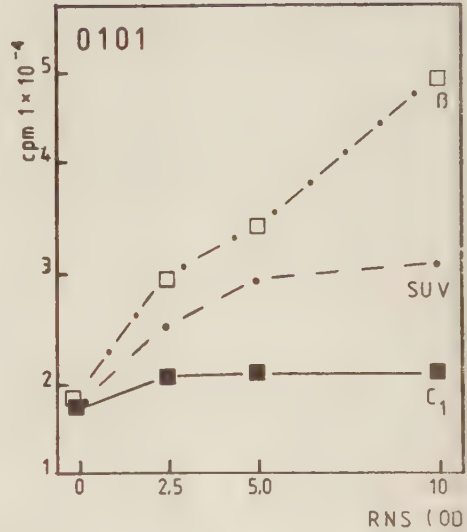
Nach diesen Ergebnissen muß geprüft werden, ob die in den Mutanten 005, 0101 und 1165 fehlende Synthese sich auf Cytochrom c_1 beschränkt oder ob die Synthese anderer mitochondrialer Proteine ebenfalls betroffen ist.

Hierzu wurden steigende Mengen an Mutanten RNS (angegeben in OD) in Retikulozytenlysate eingesetzt, in vitro translatiert und anschließend mit Antiseren gegen SU β der F_1 -ATPase, SU V des bc_1 -Komplexes und Cytochrom c_1 immunpräzipitiert. Aus den Abb. 12 a - c ist zu ersehen, daß im Vergleich zum Wildtyp mit steigender RNS-Menge der Mutanten 0101 und 1165 die Syntheserate der SU V des bc_1 -Segments sowie der SU β der F_1 -ATPase zunimmt, jedoch nicht die Syntheserate für Cytochrom c_1 . Wird in diesen Mutanten wirklich keine mRNS für Cytochrom c_1 gebildet?

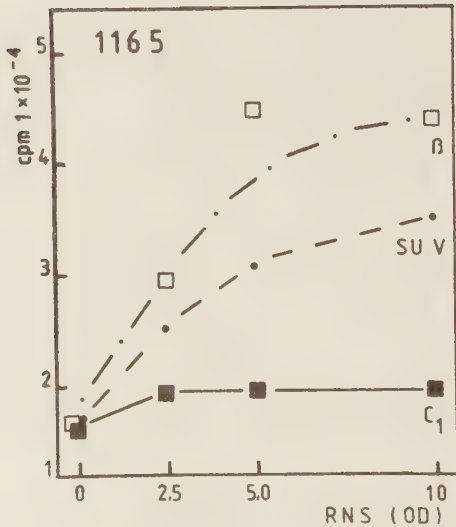
Eine weitere Bestätigung der oben beschriebenen Resultate sollte durch ein Mischexperiment mit Wildtyp-mRNS und Mu-



a)



b)



c)

Abb. 12 In vitro Synthese mitochondrialer Proteine im Retikulozytensystem.

Die Stimulierung des Einbaus von ³⁵S - Methionin in immunpräzipitierbares Material pro 1 ml Lysat ist als Funktion eingesetzter Hefe RNS - Menge dargestellt.

- a) Wildtyp
- b) Mutante 0101
- c) Mutante 1165

β = Subunit β der F₁ - ATPase
 SU V = Subunit V (Rieske Protein) des bc₁- Komplexes

c₁ = Cytochrom c₁

tanten-mRNS erzielt werden. Wildtyp- und Mutanten RNS wurden in variierenden Mengen bei einer definierten Endkonzentration von 10 OD miteinander gemischt, im Lysat translatiert und die Translationsprodukte mit Anti-c₁-Serum immunpräzipitiert. Nach Auftrennung im SDS-Gel wurden die identifizierten Cytochrom c₁-Banden solubilisiert und die Radioaktivität gemessen. Tabelle 8 zeigt das Resultat dieser Messungen.

RNS Mengen in OD	Mutante 1165	Mutante 0101
10 OD Mutante 0 OD WT	1100 cpm	1750 cpm
9,5 OD Mutante 0,5 OD WT	1360 cpm	9450 cpm
8,0 OD Mutante 2,0 OD WT	77.000 cpm	73.000 cpm
5,0 OD Mutante 5,0 OD WT	140.200 cpm	127.000 cpm
0 OD Mutante 10 OD WT	153.500 cpm	153.000 cpm

Tabelle 8 : In vitro "Mischexperiment": Wildtyp- und Mutanten RNS werden bei einer Endkonzentration von 10 OD in variierenden Mengen gemischt, im Lysat translatiert und mit Anti-c₁-Serum immunpräzipitiert. Nach Auftrennung im 12,5% SDS-Gel werden die spezifischen c₁-Banden solubilisiert und die Radioaktivität in cpm gemessen (10 OD = 40 ug RNS).

Steigende Mengen an Wildtyp-RNS führen zu einer Zunahme der mit Cytochrom c₁-Antiseren präzipitierbaren Radioaktivität, unabhängig von der Konzentration an Mutanten-RNS.

Da die in vitro Translation des Wildtyp-Cytochroms c₁ somit

nicht durch die Mutanten-RNS gehemmt wird, enthalten die Mutanten 1165 und 0101 keine translatierbare mRNS für Cytochrom c_1 . Dies trifft wahrscheinlich auch für die Mutante 005 zu (hier nicht gezeigt).

11. Korrelation der biochemischen und genetischen Daten

Die biochemischen Daten und genetischen Analysen erlauben folgende Aussagen:

die Mutanten der Komplementationsgruppe I und II präsentieren in der Reifung von Cytochrom c_1 ein homogenes Bild. Sie akkumulieren neben der M-Form die I-Form und bilden ein primäres Translationsprodukt (P-Form), das nach in vivo Markierung in Gegenwart von CCCP oder nach in vitro Translation nachgewiesen werden kann. Eine kovalent gebundene Hämgruppe ist mit Sicherheit nur an der M-Form nachzuweisen. Im Vergleich zum Wildtyp lassen sich keine Veränderungen in der Primärstruktur der c_1 -Polypeptide P und I feststellen. Die Wirkung der Mutation in diesen c_1 Mutanten könnte auf einen enzymatischen Defekt in der Reifung des Cytochroms c_1 zurückzuführen sein, der im diploiden, heterozygoten Zustand komplementiert wird.

Der Komplementationsgruppe III sind die Mutanten zugeordnet, die im Strukturgen von Cytochrom c_1 verändert sein dürften. Die Mutanten 2006 und 2024 zeigen den gleichen c_1 Phänotyp wie die Mutanten der Komplementationsgruppe I und II:

sie akkumulieren die I- und M-Form und bilden das primäre Translationsprodukt in vitro. Weiterhin weisen sie kovalent gebundenes Häm sowohl an der I-Form als auch an der M-Form auf. Diese Mutanten akkumulieren im heterozygoten, diploiden

Zustand I und M, was auf einen Defekt im Strukturgen von c_1 schließen läßt, der die normale Reifung des Cytochroms c_1 entweder verlangsamt oder verhindert. Die Vermutung eines Strukturdefekts wird durch die geringfügigen strukturellen Veränderungen der P- und I-Formen in den zwei-dimensionalen "Fingerprints" unterstützt. Die Mutanten 0101, 1165 und 005 akkumulieren in vivo keine der drei Cytochrom c_1 -Formen und enthalten auch keine translatierbare mRNS für Cytochrom c_1 . Der mutative Defekt in allen Mutanten, die in vitro das primäre Translationsprodukt (P-Form) bilden, scheint im Reifungsschritt von I zu M zu liegen.

E. DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Suche nach pet^- Mutanten die Defekte im Strukturgen für Cytochrom c_1 tragen. Voraussetzungen für dieses Projekt wurden durch die Selektion karyotischer Mutanten geschaffen, die einen spezifischen Ausfall des Cytochroms c_1 des bc_1 -Komplexes der Atmungskette aufweisen. Das alleinige Fehlen der charakteristischen Absorptionsbande von Cytochrom c_1 wurde als Hinweis auf einen spezifischen Defekt in der Biogenese dieses Polypeptids oder in der Anheftung von Häm gewertet. Zu erwarten waren Defekte sowohl im Strukturgen des Cytochroms c_1 oder dessen Promotorregion als auch Defekte im posttranslationalen Processing, Transport und der Assemblierung (Schatz, 1979).

Der spektrale Ausfall ist in allen Mutanten das Ergebnis einer Mutation mindestens eines Kerngenes. Die neun untersuchten c_1^- Mutanten zeigen zwei unterschiedliche, immunologisch analysierbare Phänotypen. Sechs c_1^- Mutanten reichern neben dem Wildtyp-Cytochrom c_1 -Produkt (M-Form, 31 Kd) ein 34 Kd Polypeptid an, während in drei Mutanten kein Cytochrom c_1 -Produkt nachgewiesen werden konnte. Durch vergleichende Analysen der Immunreaktion mit Anti- c_1 -Serum, der elektrophoretischen Beweglichkeit sowie der Peptidfragmente nach begrenzter Proteolyse wurde der Beweis erbracht, daß das 34Kd Polypeptid mit Apocytochrom c_1 (M-Form) nicht nur immunologisch sondern auch strukturell verwandt ist. Das identifizierte 34 Kd Polypeptid ist identisch mit der von Ohashi (unveröffentlicht) als I-Form bezeichneten Vorstufe des Cytochroms c_1 . Ein Cytochrom c_1 homologes 35 Kd Polypeptid akkumulierte in einigen

c_1^- Mutanten bereits nach Pulsmarkierungsversuchen. Markierungskinetiken in Gegenwart von CCCP als auch in vitro Translationsexperimente identifizierten dieses Polypeptid als Cytochrom c_1 - Precursorform (P- Form , 35 Kd), die eine Vorstufe der intermediären I - und reifen M - Form ist. (Bezeichnung P - I - M , Ohashi, unveröffentlicht).

Die genetische Analyse ordnet die charakterisierten c_1^- Mutanten drei Komplementationsgruppen zu. Alle Mutanten der Komplementationsgruppe III zeigen Eigenschaften, die auf eine Mutation des Strukturgens für Cytochrom c_1 hindeuten. Zwei dieser Mutanten (2006 und 2024) akkumulieren nach Kreuzung mit Wildtypzellen im heterozygoten Zustand neben der M- Form auch die I- Form. Dieses Ergebnis kann dahingehend interpretiert werden, daß in der diploiden Zelle die M - Form vom intakten Strukturgen des Wildtyps und die I-Form vom defekten Strukturgen der Mutanten gebildet werden. Die geringfügigen Veränderungen der Aminosäuresequenzen der P- und I-Formen, welche in diesen Mutanten durch zwei - dimensionale Fingerprintanalysen nachgewiesen werden konnten, sind möglicherweise auf eine " missense "- Mutation zurückzuführen, die zwar die Funktion beeinflusst, aber nicht die Bildung des Cytochrom c_1 -Precursors (P-Form). Bei drei Mutanten (1165, 0101, 005) dieser Komplementationsgruppe III, die in vivo kein Cytochrom c_1 - Produkt akkumulieren, traten kaum spontane Revertanten auf. Die naheliegende Interpretation, daß es sich um eine Deletion im Strukturgen für Cytochrom c_1 handelt, konnte ausgeschlossen werden, da nach UV-Induktion eine hohe Reversionsrate festgestellt werden konnte (Haid, persönliche Mitteilung),

was eher auf eine Punktmutation hindeutet. In in vitro Translationsexperimenten konnte in diesen drei Mutanten keine translatierbare Cytochrom c_1 - mRNA nachgewiesen werden. Nach diesen Befunden ist es naheliegend, daß die Cytochrom c_1 - mRNA nicht synthetisiert wird, was auf einen Defekt in der Expression des Strukturgens hinweist (Promotormutanten). Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß es sich um eine Mutation handelt, die eine frühzeitige Terminierung der Translation des Cytochrom c_1 - Polypeptids bedingt und das so gebildete Fragment zu geringe antigene Determinanten besitzt, um nachgewiesen werden zu können. Nach vorliegenden Daten sind die c_1^- Mutanten der Komplementationsgruppe III im Strukturgen für Cytochrom c_1 oder dessen regulatorische Sequenzen defekt. Die Mutanten der Komplementationsgruppen I und II tragen nach vorgelegten Befunden einen Defekt in einem der Reifungsschritte des Cytochroms c_1 , der nach Kreuzung mit Wildtypzellen im heterozygoten, diploiden Zustand komplementierbar ist. Diese c_1^- Mutanten tragen nachweislich keine kovalent gebundene Hämgruppe an der I-Form und sind möglicherweise in der Häm-anheftung defekt.

Nach bislang publizierten Daten ist bekannt, daß die meisten der karyotisch codierten mitochondrialen Polypeptide außerhalb des Organells als Precursoren gebildet werden, die größer sind als die reifen Polypeptide im Mitochondrium. Der Import dieser Precursoren in die Mitochondrien ist von der Proteinsynthese unabhängig, jedoch von energiereichen Phosphatbindungen abhängig (Schatz, 1979). Die vorher dargestellten experimentellen Befunde zum Modus des Processings

von Cytochrom c_1 in den c_1^- Mutanten unterstützen die Ergebnisse von Ohashi (unveröffentlicht), die einen Mehrstufenprozeß bei der Reifung dieses Cytochroms aufzeigen. Die Aufeinanderfolge der Processingstufen ist geklärt; der Weg geht von P (Precursor, 35 Kd) über I (intermediäres Produkt, 34 Kd) zu M (reifes Protein, 31 Kd).

Cytochrom c_1 stellt somit nach bisherigen Untersuchungen eine Ausnahme bezüglich der Reifung mitochondrialer Proteine dar, denn nie zuvor gab es Hinweise auf ein Mehrstufen - Processing.

Dieser Mehrstufenprozeß ist wie folgt belegt:

1. Für viele mitochondriale Proteine (Schatz, 1979) wurde bereits demonstriert, daß die höher molekularen Precursoren sowohl in zellfreien Systemen (in vitro) als auch in pulsmarkierten, intakten Hefezellen (in vivo) nachzuweisen sind. Ihre gemeinsamen Kriterien sind: sie werden an cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert, durchs Cytosol geschleust, durch einen posttranslationalen Mechanismus in die Mitochondrien transferiert und unterscheiden sich in ihrer Eigenschaft von den funktionalen Endprodukten.

2. Böhni et al. (1980) beschreiben eine für den Proteinimport in die Mitochondrien notwendige Protease. Sie schneidet alle bisher untersuchten cytoplasmatisch synthetisierten Precursoren zu ihrer reifen Form. Diese Protease scheint in allen c_1^- Mutanten, die einen Precursor synthetisieren, korrekt zu schneiden. In keiner dieser untersuchten c_1^- Mutanten wird das Processing von P zu I verhindert. (vgl. Kapitel 5. und 10, Teil II)

3. Das Precursorprotein ist außerhalb der mitochondrialen Innenmembran zu lokalisieren. Bestätigt wird diese Annahme durch die Befunde, daß der Precursor in Gegenwart von CCCP, welches den Transport von Precursorproteinen ins Mitochondrium blockiert, akkumuliert wird. (vgl. Kapitel 5. Teil II). Die intermediäre I-Form des Cytochroms c_1 dagegen konnte Membranfraktionen zugeordnet werden (Daum, Gasser, persönliche Mitteilung). Mit großer Wahrscheinlichkeit ist die I-Form zumindest teilweise in der Innenmembran des Mitochondriums zu lokalisieren. Dies kann angenommen werden, da zur Umwandlung des Precursors in die I-Form die Matrix-Protease erforderlich ist und CCCP die Bildung dieses Zwischenproduktes hemmt.

4. Im zellfreien System eines Retikulozytenlysats, welches mit Hefe-RNS programmiert war, wurden mitochondriale Precursoren synthetisiert. Durch Hinzufügen unmarkierter Mitochondrien konnten diese zu ihrer reifen Form umgewandelt werden (Schatz, 1979). Um den Modus des Processings zu studieren, wurde versucht, das in vitro translatierte primäre Cytochrom c_1 -Produkt einiger c_1^- Mutanten in Wildtypmitochondrien zu importieren. Bisher konnte leider unter den gewählten in vitro Import - Bedingungen die Precursorform nur bis zum intermediären c_1 -Produkt prozessiert werden. Die reife M-Form konnte in keinem Experiment identifiziert werden (Gasser, persönliche Mitteilung). Dieses Ergebnis könnte dahingehend interpretiert werden, daß die gewählten Versuchsbedingungen, die sich für z.B. den Transport von SU der F_1 - ATPase in Mitochondrien eigneten (Schatz, 1979), für das proteolyseempfindliche Cytochrom c_1 modifiziert

werden müssen. Eine andere Interpretation wäre gegeben, wenn die identifizierte M-Form nicht dem reifen Cytochrom c_1 - Polypeptid entspräche, sondern ein proteolytisches Degradationsprodukt darstellen würde.

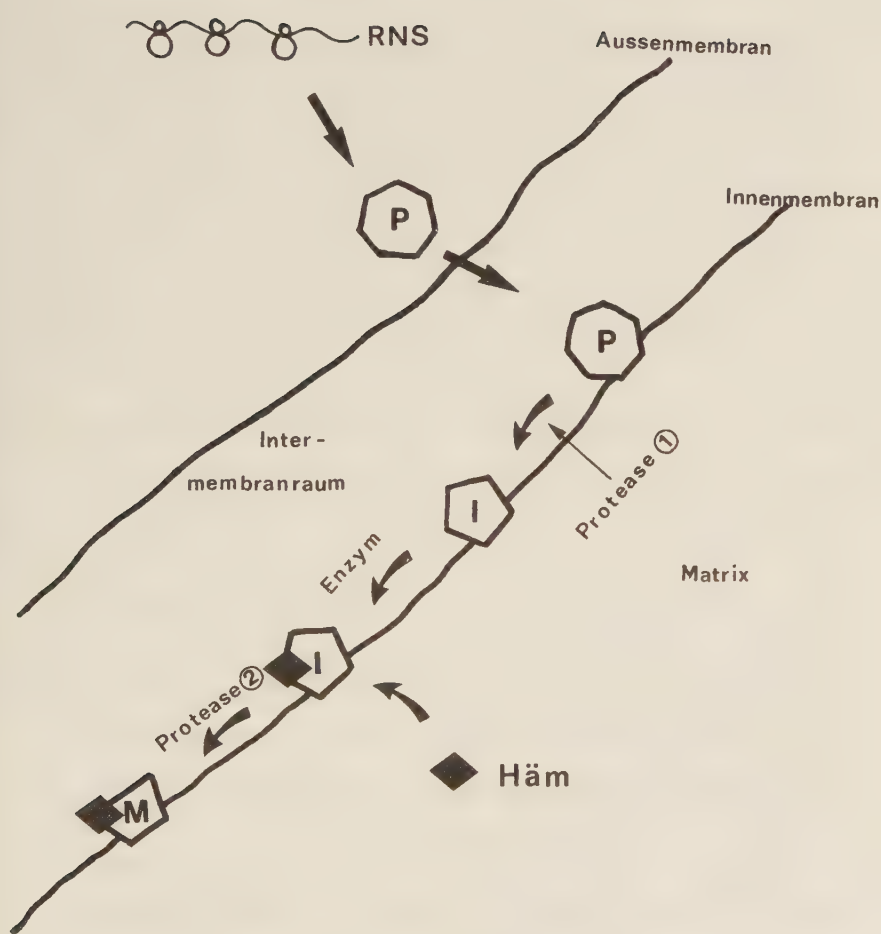
5. Arbeiten zur drei-dimensionalen Struktur des bc_1 - Komplexes in Neurospora crassa von Weiss und Mitarbeitern, geben detaillierte Hinweise zur Lokalisation des Cytochroms c_1 . Demzufolge ragen 80% des Cytochroms c_1 von der Außenseite der Innenmembran in den intermembranen Zwischenraum des Mitochondriums. Dieser Anteil trägt Häm und tritt in Wechselwirkung mit Cytochrom c. Weniger als 20% des Proteins ist in der Innenmembran integriert. (Yun Li et al., im Druck).

6. Die Akkumulation des intermediären Cytochrom c_1 - Produktes in den c_1^- Mutanten ermöglichte den Nachweis einer kovalent gebundenen Hämgruppe sowohl an der I- als auch an der M-Form. Im Vergleich zur Wildtyp-M-Form zeigen die benzidiningefärbten, hämtragenden M-Formen der c_1^- Mutanten eine deutlich schwächere Farbreaktion. Dies deutet darauf hin, daß Häm in den M-Formen der c_1^- Mutanten in geringerer Konzentration als in der Wildtyp-M-Form vorhanden ist. Dieser Befund könnte die Atmungsdefizienz der c_1^- Mutanten erklären.

Die Lokalisation der I-Form, der Mechanismus der Anheftung des Häms sowie der Umwandlung der I-Form zur M-Form sind bis heute noch unbekannt. Basile et al. (1980) postulieren für Cytochrom c - Species ein Enzym, die " Cytochrom c - Synthetase ", welche die Anheftung von Häm an das Apoprotein direkt katalysiert. Vorstellbar wäre ein solches Enzym für die Anheftung von Häm an das intermediäre Cytochrom c_1 - Polypeptid. Weiterhin offen ist die Frage nach der Anzahl der am Processing be-

teiligten Enzyme. Es können mindestens drei Enzyme angenommen werden: 1. die Matrix-Protease, die P zu I schneidet, 2. eine Protease, die I zu M umwandelt und 3. ein Enzym, welches für die Anheftung von Häm verantwortlich ist. Hierbei kann nicht ausgeschlossen werden, daß es sich um einen Enzymkomplex handelt, dem zwei oder alle Aktivitäten zugesprochen werden könnten. Vereinbar mit den vorliegenden Resultaten wäre folgendes Modell für das Processing von Cytochrom c₁, das nachfolgend schematisch dargestellt ist:

1. der Precursor wird an cytoplasmatischen Ribosomen gebildet und an die innere Mitochondrienmembran transportiert;
2. die mitochondriale Matrix-Protease schneidet den Precursor zur intermediären I-Form;
3. nach der Anheftung von Häm an die I-Form wird I durch eine weitere Protease zur M-Form geschnitten.



Schematische Darstellung des Processing - Modells für
Cytochrom c_1

Ausblick

In nächster Zukunft sollte die Richtigkeit des Processing-Modells überprüft werden. Dies schließt ein, die identifizierten Cytochrom c_1 - Polypeptide zu lokalisieren sowie die Anzahl der am Processing beteiligten Enzyme zu bestimmen. Weiterhin muß nachgewiesen werden, ob die identifizierte M-Form in den c_1^- Mutanten, die mit dem Wildtypprodukt im SDS - Gel komigriert, wirklich dem reifen Apoprotein entspricht oder ob es ein proteolytisches Abbauprodukt darstellt. Ferner soll durch Aminosäure - Sequenzanalyse der N-Termini eine definierte Zuordnung der Cytochrom c_1 - Polypeptide gewährleistet und geklärt werden, ob die Precursorform am Amino - oder Carboxy - terminalen Ende geschnitten wird.

Die c_1^- Mutanten der Komplementationgruppe III bieten eine ausgezeichnete Voraussetzung, das Strukturgene von Cytochrom c_1 zu isolieren. Durch Transformationstechniken könnte die Nukleotidsequenz des Cytochrom c_1 Gens erfaßt werden. Untersuchungen von Revertanten könnten, wie im Falle des Cytochrom c genes, dazu dienen, " second site " Auswirkungen zu analysieren.

Die angestrebte Durchführung der dargestellten Experimente könnte zur Identifizierung, Isolierung und Sequenzierung des Cytochrom c_1 Genes führen. Es wäre dann das erste genetisch und biochemisch gut charakterisierte, karyotische Gen für ein Mitochondrienmembranprotein.

F. Z U S A M M E N F A S S U N G

Aus einer Vielzahl rezessiver, karyotischer Mutanten, welche die Befähigung zum Wachstum auf nicht vergärbaren Substraten verloren haben, wurden Stämme mit einem Defekt in den Atmungskettenkomplexen III (bc_1 -Komplex) oder IV (Cytochrom-c-Oxidase) isoliert. Unter diesen konnte eine Gruppe, die einen spezifischen Ausfall des funktionsfähigen Cytochroms c_1 aufwies, identifiziert werden. Die genetischen und biochemischen Analysen dieser Cytochrom c_1 Mutanten führten zu folgenden Resultaten und Schlüssen.

1. Der Cytochrom c_1 Phänotyp ist in allen Mutanten wahrscheinlich das Ergebnis einer Mutation eines einzigen karyotischen Gens, da die Mutation fast ausschließlich die Biosynthese des Cytochroms c_1 - nicht die anderen Untereinheiten des bc_1 -Segments beeinflusst.
2. Durch paarweise Kreuzung und Bestimmung atmungskompetenter Diploider konnten die 9 charakterisierten Mutantenstämme drei Komplementationsgruppen zugeordnet werden.
3. Die c_1 Mutanten der Komplementationsgruppen I und II besitzen den gleichen, biochemisch analysierbaren, Phänotyp. Die Mutanten beider Gruppen akkumulieren - im Gegensatz zum Wildtyp - in vivo ein 34 Kd Polypeptid (I-Form), dessen Strukturverwandtschaft zum Apocytochrom c_1 (M-Form) durch immunologische und proteolytische "Fingerprint" Methoden nachgewiesen werden konnte. Nach Kreuzung der Mutanten mit dem Wildtyp ist dieses Polypeptid in den daraus resultierenden diploiden Heterozygoten

nicht mehr zu identifizieren. Die in den Mutanten dieser Gruppen akkumulierende I-Form trägt keine nachweisbare kovalent gebundene Hämgruppe. Die Precursorform (P-Form, 35 Kd) und das intermediäre Cytochrom c_1 -Produkt (I-Form, 34 Kd) zeigen im Vergleich zum Wildtyp keine nachweisbaren Veränderungen in der Primärstruktur.

4. Mutanten der Komplementationsgruppe III lassen unterschiedliche Cytochrom c_1 Phänotypen erkennen. Zwei Mutanten reichern - ähnlich den Mutanten der Gruppe I und II - das 34 Kd Polypeptid (I-Form) an. Dieses trägt jedoch kovalent gebundenes Häm und akkumuliert auch im diploiden, heterozygoten Zustand die I-Form. Peptidkartierungen der Precursorformen als auch der I-Formen deuten auf eine leicht veränderte Primärstruktur hin. Drei weitere Mutanten dieser Gruppe zeichnen sich dadurch aus, daß sie weder in vivo noch in vitro immunologisch nachweisbares Cytochrom c_1 synthetisieren. Dies deutet auf ein Fehlen der translatierbaren mRNA hin.

5. Der Reifungsprozeß zu einem funktionsfähigen Cytochrom c_1 Protein erfolgt in mehreren Stufen. Die im Cytoplasma synthetisierte Precursorform wird in das Mitochondrium importiert und dort zur intermediären I-Form (34 Kd) prozessiert. Nachdem Häm kovalent gebunden ist, erfolgt die Umwandlung in die reife M-Form, das Apocytochrom c_1 .

Die Korrelation der genetischen und biochemischen Daten stützt die Annahme, daß

- die Mutanten der Komplementationsgruppen I und II Mutationen in den Genen tragen, die an der enzymatischen

Umwandlung der I-Form zur M-Form beteiligt sind und

- die Mutanten der Komplementationsgruppe III im Strukturgen für das Apocytochrom c_1 mutiert sind.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J.H., Staden, R., Young, I.G. " Sequence and organization of the human mitochondrial genome " *Nature* 290, 457 - 474 (1981)
- Bachhofen, V., Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaudewitz, F. " Quantitative selection of respiratory deficient mutants in yeast by TTC " *Z. Naturforsch.* 27 b, 252 - 256 (1972)
- Basile, G., Di Bello, C., Taniuchi, H. " Formation of an iso-1-cytochrome c - like species containing a covalently bonded heme group from the apoprotein by a yeast cell-free system in the presence of hemin " *J.Biol.Chem.* 255, 7181 - 7191 (1980)
- Boehni, P., Gasser, S., Leaver, C., Schatz, G. " A matrix-localized mitochondrial protease processing cytoplasmically-made precursors to mitochondrial proteins " in : *Organization and Expression of the Mitochondrial Genome* (Kroon, A.M., Saccone, C., eds.) North-Holland, Amsterdam, 423 - 433 (1980)
- Borst, P., Grivell, L.A. " The mitochondrial genome of yeast " *Cell* 15, 705 - 727 (1978)
- Brock, T.D. " Inhibition of growth of yeasts by 2,3,5-triphenyl-tetrazoliumchloride (TTC)" *Naturwissenschaften* 45, 216 (1958)
- Clark, J.B., Greenbaum, A.L., Slater, T.F. " Effects of tetrazolium salts on oxydative phosphorylation in rat-liver mitochondria " *Biochem.J.* 94, 651 - 654 (1965)
- Cleveland, D.W., Fisher, S.G., Kirschner, M.W., Laemmli, U.K. " Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulphate and analysis by gel electrophoresis " *J.Biol.Chem.* 252, 1102 - 1106 (1977)
- Côté, C., Solioz, M., Schatz, G. " Biogenesis of the cytochrome bc₁ complex of yeast mitochondria. A precursor form of the cytoplasmically made Subunit V " *J.Biol.Chem.* 254, 1437 - 1439 (1979)
- Darnell, J.E. " Implications of RNA-RNA splicing in evolution of eukaryotic cells " *Science* 202, 1257 - 1260 (1978)
- Douglas, M., Butow, R.A. " Variant forms of mitochondrial translation products in yeast : evidence for location of determinants on mitochondrial DNA " *Proc.Nat.Acad.Sci.* 73, 1083 - 1086 (1976)

- Downie, A.J., Stewart, J.W., Brockman, N., Schweingruber, A.M., Sherman, F. " Structural gene for yeast iso-2-cytochrome c " *J.Mol.Biol.* 113, 369 - 384 (1977)
- Ebner, E., Mennucci, L., Schatz, G. " Mitochondrial assembly in respiration-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. I. Effect of nuclear mutations on mitochondrial protein synthesis " *J.Biol.Chem.* 248, 5360 - 5368 (1973)
- Ebner, E., Mason, T.L., Schatz, G. " Mitochondrial assembly in respiration-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. II. Effect of nuclear and extrachromosomal mutations on the formation of cytochrome c oxidase. " *J.Biol.Chem.* 248, 5369 - 5378 (1973)
- Elder, J.H., Pickett, R.A., Hampton, J., Lerner, R.A. " Radioiodination of proteins in single polyacrylamide gel slices " *Eur.J.Biochem.* 252, 6510 - 6515 (1977)
- Ephrussi, B. " Cytoplasmic heridity in yeasts " in : *Nucleocytoplasmic relations in microorganisms*, Oxford, at the Clarendon Press, 13 - 50 (1953)
- Estabrook, R.W. " Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP : O ratio " in: *Methods of Enzymology* (Colowick, S.P., Kaplan, N.O. eds.) New York : Academic Press Bd. 10, 41 - 47 (1967)
- Gillham, N.W. " Organelle Heridity " , Raven Press, New York (1978)
- Haid, A., Schweyen, R.J., Bechmann, H., Kaudewitz, F., Solioz, M., Schatz, G. " The mitochondrial COB- region in yeast codes for apocytochrome b and its mosaic " *Eur.J.Biochem.* 94, 451 - 464 (1979)
- Kroon, A.M., Saccone, C. " The organization and Expression of the Mitochondrial Genome " Elsevier / North-Holland Bio-medical Press (1980)
- Kessler, St.W. " Cell membrane antigene isolation with the Staphylococcal protein A-antibody adsorbent " *J.of Immunology* 117, 1482 - 1490 (1976)
- Laemmli, U.G. " Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the Bacteriophage T4 " *Nature* 227, 680 - 685 (1970)
- Lewin, S.L., Gregor, I., Mason, T.L., Nelson, N., Schatz, G. " Cytoplasmically made subunits of yeast mitochondrial F₁-ATPase and cytochrome c oxidase are synthesized as individual precursors, not as polyproteins " *Proc.Nat.Acad.Sci.* 77, 3998 - 4002 (1980)
- Lloyd, P. " The Mitochondria of Microorganisms " , London: Academic Press (1974)

- Lowry, D.H., Rosebough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. " protein measurement with the folin phenol reagent "
J.Biol.Chem. 193, 265 - 275 (1951)
- Maccacchini, M.-L., Rudin, Y., Blobel, G., Schatz, G. " Import of proteins into mitochondria: precursor forms of the extramitochondrially made F₁-ATPase subunits in yeast "
Proc.Nat.Acad.Sci. 76, 343 - 347 (1979)
- Mason, T.L., Poyton, R.O., Wharton, D.C., Schatz, G. " Cytochrome c oxidase from Bakers' Yeast. I. Isolation and properties "
J.Biol.Chem. 248, 1346 - 1354 (1973)
- Mason, T.L., Schatz, G. " Cytochrome c oxidase from Bakers' Yeast. II. Site of translation of the protein components "
J.Biol.Chem. 248, 1355 - 1360 (1973)
- Matoon, J.R., Balcavage, W.X. " Properties of Saccharomyces cerevisiae mitochondria prepared by a mechanical method "
Biochim.Biophys.Acta 153, 521 - 530 (1968)
- Nelson, N., Schatz, G. " Energy-dependent processing of cytoplasmically made precursors to mitochondrial proteins "
Proc.Nat.Acad.Sci. 76, 4365 - 4369 (1979)
- Ogur, M., John, R.St., Nagai, S. " Tetrazolium overlay technique for population studies of respiration deficiency in yeast ."
Science 169, 339 - 344 (1957)
- Pelham, H.R.B., Jackson, R.J. " An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates "
Eur.J.Biochem. 67, 247 - 256 (1976)
- Penman, S. " RNA metabolism in the Hela nucleus "
J.Mol.Biol. 17, 117 - 130 (1966)
- Ross, R., Schatz, G. " Cytochrome c₁ of Bakers' Yeast. I. Isolation and properties "
J.Biol.Chem. 251, 1991 - 1996 (1976)
- Ross, E., Schatz, G. " Cytochrome c₁ of Bakers' Yeast. II. Synthesis on cytoplasmic ribosomes and influence of oxygen and heme on accumulation of the apoprotein "
J.Biol.Chem. 251, 1997 - 2004 (1976)
- Sherman, F., Stewart, J.W., Margoliash, E., Parker, J., Campbell, W. "The structural gene for yeast iso-1-cytochrome c "
Proc.Nat.Acad.Sci. 55, 1498 - 1504 (1966)
- Sherman, F., Stewart, J.W. " The genetic control of yeast iso-1- and iso-2-cytochrome c after 15 years "
Biochemistry and Genetics of Yeast : Academic Press
273 - 315 (1978)

- Schatz,G.,Klima,J. " Triphosphopyridine nucleotide: cytochrome c reductase of Saccharomyces cerevisiae: a " microsomal " enzyme " Biochim.Biophys.Acta 81, 448 - 461 (1964)
- Schatz,G., Kovac,L. " Isolation of promitochondria from aerobically grown Saccharomyces cerevisiae " in: Methods in Enzymology 31, (Fleischer, S., Packer, L. eds.) New York: Academic Press 627 - 632 (1974)
- Schatz,G., Mason,T.L. " The biosynthesis of mitochondrial proteins " Annu.Rev.Biochem. 43, 51 - 87 (1974)
- Schatz,G. " How mitochondria import proteins from the cytoplasm " FEBS Letters 103, 203 - 211 (1979)
- Thomas,P.E., Ryan,D., Levin,W. " An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels " Anal.Biochem. 75, 168 - 176 (1976)
- Thorell,J.L., Johansson,B.G. " Enzymatic iodination of polypeptides with ¹²⁵I to high specific activity " Biochim.Biophys.Acta 251, 363 - 369 (1971)
- Towbin,H., Staehelin,T., Gordon,J. " Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications " Proc.Nat.Acad.Sci. 76, 4350 - 4354 (1979)
- Tzagoloff,A. " Assembly of the mitochondrial membrane system. IV. Role of mitochondrial and cytoplasmic protein synthesis in the biosynthesis of the rutamycin-sensitive adenosine triphosphatase " J.Biol.Chem. 246, 3050 - 3056 (1971)
- Tzagoloff,A., Akai,A., Needeleman,B. " Assembly of the mitochondrial membranesystem : Isolation of nuclear and cytoplasmic mutants of Saccharomyces cerevisiae with specific defects in mitochondrial functions " J.Bacteriol. 122, 826 - 831 (1975)
- Tzagolof,A., Akai,A., Needleman,R.B. " Assembly of the mitochondrial membrane system. Characterization of nuclear mutants of Saccharomyces cerevisiae with defects in mitochondrial ATPase and respiratory enzymes " J.Biol.Chem. 250, 8228 - 8235 (1975)
- Wolf,K. " Induktion, selektive Anreicherung, genetische und biochemische Charakterisierung atmungsdefekter Mutanten der Spaltheefe Schizosaccharomyces pombe l. " Dissertation (1973)

Yun Li, Leonard, K., Weiss, H. " membrane-bound and water-soluble cytochrome c₁ from Neurospora mitochondria "
Eur.J.Biochem. im Druck

Zsolt, J. " Selective action of triphenyltetrazolium - chloride against yeast "
Naturwissenschaften 47, 255 (1960)

Am Ende der Arbeit möchte ich allen Mitarbeitern des Genetischen Institutes herzlich danken, die an der Entstehung der Dissertation beteiligt waren.

Mein besonderer Dank gilt :

- Herrn Prof.Dr.F.Kaudewitz für die Aufgabenstellung und Betreuung der Arbeit;
- Herrn Prof.Dr.G.Schatz für seine Kooperationsbereitschaft, für zahlreiche Diskussionen und Unterstützung während meines Gastaufenthaltes am Biozentrum Basel, sowie für die Bereitstellung der Antiseren gegen die Untereinheiten I bis VI des bc_1 -Komplexes;
- Herrn Dr.A.Haid für seine Betreuung und Einführung in immunologische Techniken, praktische Hinweise sowie stete Diskussionsbereitschaft und Interesse an den Versuchsergebnissen;
- allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Schatz - vor allem Dr.I.Gregor, Dr.T.Fox, Dr.B.Ludwig, Dr.A.Ohashi, Dr.J.Gibson und S.Gasser - für ihre Anregungen und Hilfestellungen während meines Gastaufenthaltes;
- Herrn Dr.G.Rödel und Frau Dr.E.Schmitt für ihre Unterstützung und freundschaftlichen Hilfeleistungen;
- Herrn Dr.F.Lang für die Bereitstellung der Mutantenstämme;
- der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung der Arbeit;
- der Kommission der Europäischen Gemeinschaften und der European Molecular Biology Organization (EMBO) für ein zweimonatiges bzw. dreimonatiges Stipendium während meines Arbeitsaufenthaltes am Biozentrum Basel, Schweiz.

LEBENS LAUF

- 1946 geboren in Marl am 21. Dezember
- 1952 - 1957 Volksschule in Marl
- 1957 - 1967 Besuch des neusprachlichen Mädchen-
gymnasiums St.Ursula in Dorsten
- 1967 Abitur
- 1967 - 1969 Sprachstudium : Englisch und Franzö-
sisch an der Universität München
- 1969 - 1973 Studium der Biologie an der Univer-
sität München
- 1973 - 1975 Diplomarbeit am Institut für Zoologie
und Hydrobiologie der Universität
München
- 1976 Beginn der Dissertationsarbeit am
Genetischen Institut der Universität
München bei Prof.Dr.F.Kaudewitz
- 1980 - 1981 achtmonatiger Aufenthalt bei
Prof.Dr.G. Schatz im Biozentrum der
Universität Basel, Schweiz

